

Über die Vermehrung von Potato Spindle Tuber Viroid in Zellen der Wildkartoffel

Solanum demissum

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Rainer Kern

aus Kehl am Rhein

München, 1989

Über die Vermehrung von Potato Spindle Tuber Viroid in Zellen der Wildkartoffel

Solanum demissum

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Rainer Kern

aus Kehl am Rhein

München, 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-P. Mühlbach
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-U. Koop

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1989

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung Viroidforschung durchgeführt; sie ist Teil eines Projekts der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Mu 599/2).

Ich danke

Prof. H.-P. Mühlbach für die Möglichkeit, an diesem Projekt teilzunehmen und für die stets hilfreiche Beratung in allen Phasen,

Prof. H. L. Sängers für den Arbeitsplatz, optimale Arbeitsbedingungen und sein Interesse am Fortgang der Experimente,

Dr. Martin Tabler für die Einführung in die Methoden der Molekularbiologie und ganz besonders für die anregenden Diskussionen und Tips im Verlauf der Arbeit,

Renate Luckinger für die vielseitige und tatkräftige Hilfe bei den umfangreichen Versuchen, mit der sie seit Juli 1987 wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat,

Frau Karla Ramm für die Durchführung und Überwachung der Biotests,

Waltraut Schmidt-Puchta für die Anleitung und Hilfe bei Plasmidisolierung und -sequenzierung,

Frau Johanna Kleinhans für das Spülen und Sterilisieren der Kulturflaschen, den Mitarbeitern im Gewächshaus für Anzucht und Pflege der Tomatenpflanzen, allen Mitarbeitern der Abteilung, der Bibliothek und der Werkstätten für das angenehme Arbeitsklima.

Schließlich danke ich der Max-Planck-Gesellschaft für die Gewährung eines Stipendiums und die Unterstützung der Teilnahme an Kongreßreisen.

Abkürzungen:

Abb	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bar	1 bar= 10 ⁵ Pascal
Bidest	Bidestilliertes Wasser
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zählimpulse pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NAA	Naphtylessigsäure
ng	Nanogramm
NTP	Ribo-Nukleotid
(d)NTP	(Desoxy)Nukleotid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PpI	Protoplasten
PSTVd *)	Potato spindle tuber viroid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
uM	Mikromolar
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V/V	Volumenanteile
W/V	Gewichtanteile pro Volumen
2,4-D	Dichlorphenoxyessigsäure
6-BA	Benzylaminopurin

*) Auf der Tagung der "International Viroid Working Group", 1988 in Kofu, Japan wurde als einheitliche Abkürzung für Viroide "Vd" vorgeschlagen und an das "Plant Virus Subcommittee" des "International Committee on Taxonomy of Viruses" weitergeleitet. Diese neue Abkürzung wird in der vorliegenden Arbeit weitgehend beibehalten.

1.	EINLEITUNG	1
2.	PROBLEMSTELLUNG	8
3.	MATERIALIEN	10
3.1	Chemikalien	10
3.1.1	Radioaktiv markierte Reagentien	10
3.1.2	Nukleotide	10
3.1.3	DNA-Oligonukleotide	10
3.1.4	Längenmarker	11
3.1.5	Plasmid-DNA	11
3.1.6	PSTVd-RNA	12
3.1.7	Enzyme	12
3.2	Geräte	12
3.3	Sonstiges	13
4.	METHODEN	14
4.1	Zellkulturen der Wildkartoffel <i>Solanum demissum</i>	14
4.1.1	Kalluskulturen	16
4.1.2	Suspensionskulturen	16
4.1.2.1	Bestimmung von Wachstumscharakteristika für Suspensionszellen	16
4.1.3	Protoplastenkulturen	18
4.1.3.1	Präparation von Protoplasten aus Suspensionszellen	18
4.1.3.2	Inokulation von Protoplasten	20
4.1.3.3	Mikroautoradiographie	23
4.1.3.4	Regeneration von Protoplasten	24
4.1.4	Präparation von Liposomen durch nachträgliche Entfernung der Lösungsphase (Reverse-phase evaporated vesicles REV)	29
4.1.4.1	Methode nach Fraley	29
4.1.4.2	Modifikation nach Makins	32
4.2	Konzentrierung von Nukleinsäuren	34
4.2.1	Fällung mit Ethanol	34
4.2.2	Fällung mit Isopropanol	35
4.3	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	35
4.3.1	Markierung von PSTVd-RNA mit ^{125}I	35
4.3.2	Markierung von DNA-Fragmenten mit T4-Polynukleotidkinase	36

4.3.3	Markierung von SP6-RNA durch "analytische" SP6-Transkription	37
4.4	Extraktion von Nukleinsäuren	38
4.4.1	Extraktion von Nukleinsäuren aus enzymatischen Reaktionen	39
4.4.2	Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellkulturen	40
4.4.3	Extraktion von Nukleinsäuren aus Mikrokalli und anschließende Dot-Blot-Analyse	41
4.4.4	Extraktion von Nukleinsäuren aus Tomatenblättern	42
4.5	Auftrennung von Nukleinsäuren	43
4.5.1	"Vorfraktionierung" mit Lithiumchlorid	43
4.5.2	Abtrennung von niedermolekularen Bestandteilen durch Gelfiltration	44
4.5.3	Auftrennung im Saccharosedichtegradienten	45
4.5.4	Auftrennung durch Gelelektrophorese	48
4.5.4.1	Gelelektrophorese in Agarose	48
4.5.4.2	Gelelektrophorese in Polyacrylamid	49
4.5.5	Auftrennung von DNA im Sequenzgel	53
4.6	Nachweis von Nukleinsäuren	56
4.6.1	Nachweis mit Ethidiumbromid	56
4.6.2	Nachweis durch Silberfärbung	57
4.6.3	Molekulare Hybridisierung	58
4.6.3.1	Elektrotransfer	59
4.6.3.2	Northern Hybridisierung	60
4.6.3.3	Nachweis mit Dot-Blot-Hybridisierung	62
4.7	Präparative Auftrennung von zirkulärer Viroid-RNA durch bidirektionale Gelelektrophorese	64
4.8	Elution von Nukleinsäuren aus Gelen	66
4.8.1	Elution durch Isotachophorese	67
4.8.2	Elution mit "Gene-clean"	68
4.9	Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft aus Einzel- pflanzen von Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i> "Rentita"	70
4.9.1	Gewinnung von PSTVd-cDNA durch Reverse Transkription	71
4.9.1.1	Ansatz zur Sequenzierung	71
4.9.1.2	Ansatz zur Klonierung	72

4.9.1.3	Synthese der cDNA	72
4.10	Sequenzierung nach Maxam und Gilbert	73
4.11	Klonierung von PSTVd-RNA aus Zellkultur M316 und RK46	75
4.11.1	Herstellen des geeigneten Klonierungs-Vektors	75
4.11.2	Synthese des Doppelstrangs	77
4.11.3	Ligation von PSTVd-DNA und pHa106-Vektor-DNA	79
4.11.4	Transformation von E. coli JM 83 mit Plasmid-DNA	79
4.11.4.1	Transformation mit Calciumchlorid	80
4.11.4.2	Transformation nach Hanahan	81
4.12	Analyse der rekombinanten Klone	84
4.12.1	Schnellbestimmung der Plasmidgröße ("Quicktest")	84
4.12.2	Schnellisolation von analytischen Mengen Plasmid-DNA ("MiniPräp")	85
4.13	Präparative Plasmidgewinnung	87
4.13.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly	87
4.13.2	Reinigung der Plasmid-DNA über einen Cäsiumchlorid- Gradienten	90
4.13.3	Sequenzierung der Plasmid-DNA	92
4.14	Präparative SP6-Transkription	95
4.15	Biotest	96
5.	ERGEBNISSE	97
5.1	Infektion von Zellen der Wildkartoffel <i>Solanum demissum</i> durch Liposomen	97
5.1.1	Herstellung von Protoplasten	97
5.1.2	Inokulation von Protoplasten	98
5.2	Bestimmung der Infektionseffizienz	99
5.2.1	Infektionsrate von PSTVd in Liposomen eingeschlossen	101
5.3	Regeneration von Protoplasten aus Zellen mit permanenter PSTVd-Infektion	106
5.4	Replikationsverlauf in PSTVd-inokulierten Protoplasten	107
5.4.1	Nachweis von PSTVd-RNA durch Dot-Blot-Hybridisierung	107
5.4.2	Auftrennung der Nukleinsäuren aus Protoplasten durch Gelelektrophorese	109
5.4.3	Zellkulturen mit permanenter PSTVd-Infektion	111

5.4.3.1	Bestimmung des PSTVd-Gehalts in den einzelnen Zelllinien	111
5.4.3.2	Wachstumscharakteristika der einzelnen Zelllinien	111
5.4.4	Transport von Viroid-RNA in den Zellkern	118
5.5	Analyse der Replikationsintermediären aus Protoplasten, die mit PSTVd-RNA inokuliert wurden	118
5.5.1	Auftrennung von PSTVd-RNA im Saccharosedichtegradienten	119
5.5.2	Auftrennung von Nukleinsäuren aus permanent PSTVd-infizierten Zellen	124
5.5.3	Auftrennung von RNA aus Protoplasten nach Infektion mit PSTVd-RNA	129
5.6	Untersuchung von PSTVd-RNA nach mehrjähriger Vermehrung in Zellkulturen von <i>Solanum demissum</i>	132
5.6.1	Analyse der Infektiosität von PSTVd-RNA aus den Zelllinien M316 und RK46	132
5.6.2	Sequenzierung der PSTVd-RNA aus Zellkulturen	137
5.6.3	Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft aus Tomatenpflanzen, die mit s-RNA aus Zellkulturen infiziert wurden	139
5.7	Klonierung von PSTVd-RNA aus Zellkulturen nach mehrjähriger kontinuierlicher Vermehrung in Zellkulturen von <i>Solanum demissum</i>	146
5.7.1	Zellkulturvarianten der Zelllinie M316	151
5.7.2	Die Sequenzvariante TCV 4	158
5.7.3	Zusätzliche Herstellung einer dimeren PSTVd-Einheit in pBBs106	162
5.8	Untersuchung auf Infektiosität der SP6-Transkripte aus Klonen, die aus PSTVd-RNA der Zelllinien M316 und RK46 gewonnen wurden	163
5.9	Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft der Zellkulturvarianten TCV 1-4	165
5.10	Untersuchung der SP6-Transkripte nach Umklonierung in Klon pBBs106	168
6.	DISKUSSION:	171
6.1	Infektion von Protoplasten mit PSTVd-RNA	171

6.1.1	Zwischenstufen der PSTVd-Replikation	172
6.1.2	Zeitlicher Verlauf der PSTVd-Vermehrung	176
6.1.3	Übergang zur permanent infizierten Zellkultur	180
6.2	Klonierung und Sequenzierung von PSTVd-Nachkommenschaft aus Zellkulturen und Tomatenpflanzen	181
6.2.1	Charakterisierung der Zellkulturvarianten TCV 1-3, die Gruppe der "oligo-A-Varianten"	182
6.2.2	Die Rückmutation und Funktion des "oligo-A-Bereichs"	182
6.2.3	Die Zellkulturvariante TCV 4	185
6.2.4	Modelle für das "Processing" der PSTVd-RNA	186
6.2.5	Ausgleich der Deletion in der Zellkulturvariante TCV 4, das Modell des "Brückenschlags"	189
6.2.6	Infektiosität der dimerisierten Zellkulturvariante TCV 4	191
6.3	Dynamik der Sequenzveränderungen in der PSTVd-RNA	192
7.	ZUSAMMENFASSUNG	194
8.	LITERATUR	197



1. EINLEITUNG

Die Spindelknollensucht der Kartoffel wurde erstmals 1922 von Martin (1) beschrieben. In den folgenden Jahren gelang mehreren Autoren der Nachweis, daß diese Krankheit übertragbar ist; wurden Blätter oder Zellsaft aus Blättern oder Knollen von symptomtragenden Pflanzen auf Blätter gesunder Kartoffelpflanzen übertragen und diese anschließend durch Reiben mechanisch verletzt, konnten die typischen Krankheitssymptome, die Spindel- oder Zylinderform der Kartoffelknolle mit deutlich sichtbaren "Augen" und teilweise tiefe Risse festgestellt werden. Im Jahr 1962 zeigten Raymer und O'Brien (2), daß dasselbe infektiöse Agens in der Lage war, Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.) zu infizieren und spezifische, unverwechselbare Symptome in den inokulierten Pflanzen zu induzieren. Später entdeckte man, daß weitere Pflanzenarten als Wirt und Vermehrer für das Agens der Kartoffelspindelknollensucht dienen können; fast alle gehören zur Familie der Nachtschattengewächse. Eine umfassende Zusammenstellung findet man bei Diener, 1979 (3). In vielen Pflanzen wurden aber keine spezifischen Krankheitssymptome sichtbar, und erst die Rückinokulation von Zellsaft auf die Indikatorpflanzen Tomate und Kartoffel führte zu den typischen Krankheitssymptomen, die Vermehrung in der Testpflanze konnte nur indirekt nachgewiesen werden. 1971 gelang Diener (4) bzw. Singh und Clark (5) der Nachweis, daß das "Potato Spindle Tuber Virus" (PSTV) lediglich aus Ribonukleinsäure mit niederem Molekulargewicht besteht und nicht von Hüllproteinen eingepackt ist. Sängler (6) und Semancik und Weathers (7) zeigten im darauffolgenden Jahr, daß die Exocortiskrankheit von Citrus (ExC, spätere Bezeichnung CEV) gleichfalls durch eine nicht in Protein verpackte, niedermolekulare RNA hervorgerufen wird. Der von Diener geprägte Begriff "Viroid" sollte den Unterschied dieser kleinen, nackten, infektiösen RNA-Moleküle zu Viren deutlich machen, deren DNA oder RNA mit Proteinen zu Virionen verpackt ist. Sängler et al. (8) bewiesen anhand umfangreicher Analysen, daß es sich bei diesen subviralen Pathogenen um einzelsträngige covalent geschlossene RNA-Moleküle handelt, die als stark basengepaarte Stäbchen vorliegen. Diese Ergebnisse konnten zwischen 1978 und 1982 (9,10), (Übersicht in (11)) durch die Sequenzierung von PSTVd, CEVd und CSVd (Erreger der Stauche-

krankheit von Chrysantheme) auf molekularer Ebene bestätigt werden. (siehe Abb.1: PSTVd). Alle bis heute bekannten und molekular charakterisierten Viroide haben folgende Eigenschaften:

Die Viroid-RNA besitzt eine sehr hohe Eigenkomplementarität, das heißt, größere Bereiche innerhalb des Moleküls können miteinander Basenpaarungen eingehen. Zwischen diesen Bereichen liegen kurze, ungepaarte Abschnitte, entweder als einzelne Nukleotide oder zu mehreren Nukleotiden in einer Schleife ("bulged-loop") ausgestülpt. Auch die beiden Enden des "Stäbchens" sind zu Schleifen geformt. Im zentralen Bereich des Stäbchens befindet sich eine Sequenz, die bei den meisten inzwischen isolierten und sequenzierten Viroiden fast völlig identisch ist. Sie besteht aus ca. 20 Nukleotiden im oberen Strang und ebenso vielen im unteren gepaarten Strangbereich. Dieser Bereich wird als Zentrale Konservierte Region (CCR) bezeichnet. Die Viroide der Gelbfleckung der Weinrebe (GYSVd), der Narbenhäutigkeit des Apfels (ASSVd) und der Sonnenfleckerkrankung der Avocado (ASBVd) besitzen diese hochkonservierte Sequenz allerdings nicht, sondern nur eine vergleichbare Sekundärstruktur der zentralen Region. In Tabelle A sind alle bisher molekular charakterisierten Viroide in ihrer Sequenzähnlichkeit zum PSTVd zusammengefaßt.

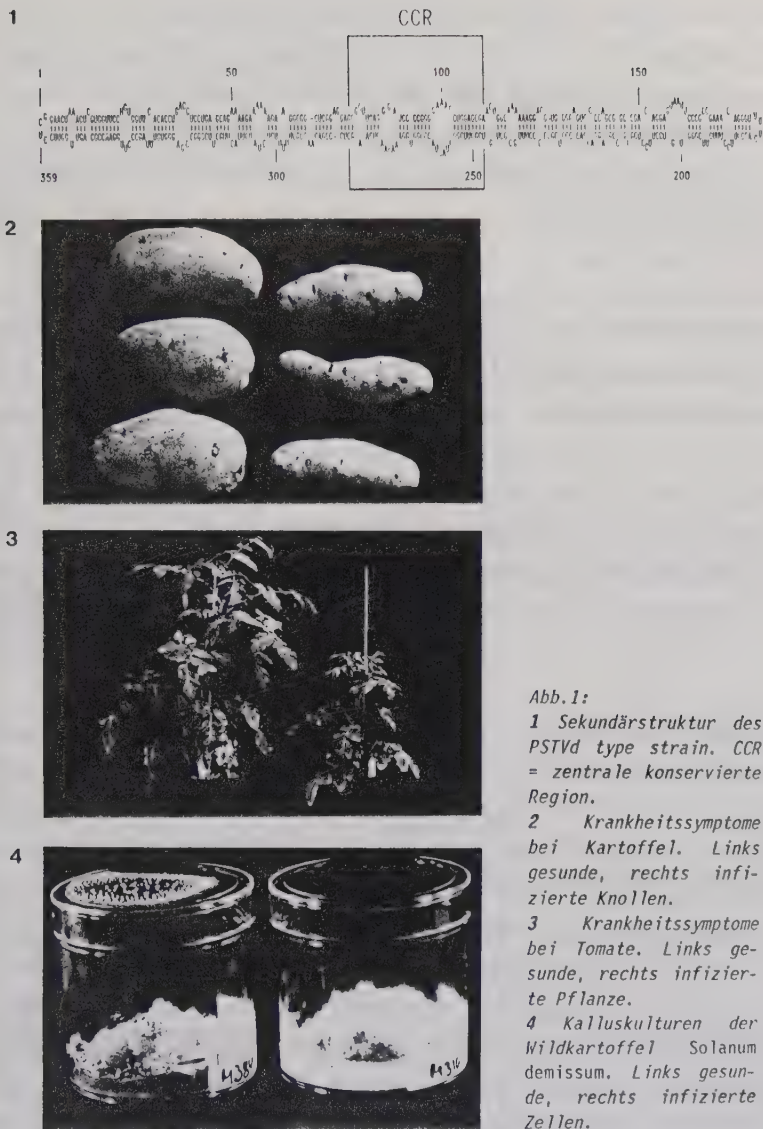


Abb.1:
1 Sekundärstruktur des
PSTVd type strain. CCR
= zentrale konservierte
Region.

2 Krankheitssymptome
bei Kartoffel. Links
gesunde, rechts infi-
zierte Knollen.

3 Krankheitssymptome
bei Tomate. Links ge-
sunde, rechts infizier-
te Pflanze.

4 Kalluskulturen der
Wildkartoffel *Solanum
demissum*. Links gesun-
de, rechts infizierte
Zellen.

Abb. 1: Das Viroid der Spindelknollensucht der Kartoffel, Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd).

Tabelle A: Übersicht über die bisher molekular charakterisierten Viroide.

Bezeichnung	Abkür- zung)	Nukleo- tidzahl	Ähn- lichkeit %**)	Literatur
Potato Spindle Tuber Viroid	PSTVd	359	100	Gross et al.(1978), Nature 273: 203 Gross et al.(1981), Biosci.Rep. 1: 235. Schnölzer et al.(1985), EMBO J. 4: 2181.
Tomato Planta Macho Viroid	TPMVd	360	77	Kiefer et al.(1983), PNAS USA 80: 6234.
Tomato Apical Stunt Viroid	TASVd	360 363	69	Kiefer et al.(1983), PNAS USA 80: 6234. Candresse et al.(1987), NAR 15: 10597.
Chrysanthemum Stunt Viroid	CSVd	354 356	66	Gross et al.(1982), Eur.J.Biochem. 121: 249. Haseloff & Symons (1981), NAR 9: 2741.
Citrus Exocortis Viroid	CEVd	371 370-375 368	60 68	Gross et al.(1982), Eur.J.Biochem. 121: 249. Visvader et al.(1982), FEBS Lett. 137: 288. Visvader et al.(1983), Virology 130: 232. Visvader & Symons (1985), NAR 13: 2907. Garcia-Arenal et al.(1987), NAR 15: 4203.
Hop Stunt Viroid	HSVd	297 298 302 299 301 303	44	Ohno et al.(1983), NAR 11: 6185. Lee et al.(1988), NAR 16: 8708. Sano et al.(1986), J.Gen.Virol.67: 1673. Puchta et al.(1988), NAR 16: 2730. Sano et al.(1988), NAR 16: 347. Puchta et al.(1989), NAR 17: 1247. Puchta et al.(1988), NAR 16: 8171. Sano et al.(1984), NAR 12: 3427.
Cucumber Pale Fruit Viroid	CPFVd	303	44	
Coconut Cadang Cadang Viroid	CCCVd	246, 247	47	Haseloff et al.(1982), Nature 299: 316.
Coconut Tinangaja Viroid	CTiVd	253	43	Keese et al.(1988), Virology 162: 508.
Avocado Sunblotch Viroid	ASBVd	246 245-247	32	Symons (1981), NAR 9: 6527. Pallas et al.(1988), NAR 16: 9864.
Apple Scar Skin Viroid	ASSVd	330		Hashimoto & Koganezawa (1987),NAR 15: 7045.
Hop Latent Viroid	HLVd	256		Puchta et al.(1988), NAR 16: 4197.
Grapevine Yellow Speckle Viroid	GYSVd	367		Koltunow & Rezaian (1988), NAR 16: 849.

*) Die Viroide werden dem neuen Vorschlag entsprechend mit "Vd" abgekürzt (vgl.: Abkürzungen)

**) Die Werte der Sequenzähnlichkeit wurden von Keese et al. (81) übernommen.

Die geringe Größe der Viroid-RNA, der damit begrenzte genetische Informationsgehalt des "Viroidgenoms" sowie die zirkuläre Struktur des Moleküls machten es relativ unwahrscheinlich, daß Viroide für Proteine oder kurze Peptide codieren können. Die Sequenzanalyse zeigte, daß weder in der Primärstruktur von PSTVd noch in der dazu komplementären (-)Viroid-RNA, die in geringen Mengen in infiziertem Pflanzengewebe vorhanden ist, das eukaryontische Initiationstriplett AUG oder Ribosomenbindungsmotive auf der 5'Seite von vorhandenen GUG-Initiationsstellen vorliegen. Auch die Zugabe von Viroid-RNA zu verschiedenen *in vitro*-Translationssystemen stimulierte nicht die Synthese von zusätzlichen Peptiden oder Proteinen. Bei dem "14 kD"-Protein (P14), das in PSTVd-infizierten Tomatenblättern gefunden wurde, handelt es sich um ein erkrankungsbezogenes Protein (pr-Protein), das ebenso bei Virus- und Pilzbefall in der Pflanze induziert wird (12). Da kein viroidkodiertes Protein gefunden werden konnte, muß eine direkte Interaktion von Pflanzenwirtsfaktoren und Viroid-RNA stattfinden, um sowohl die Vermehrung, als auch die Ausbreitung und "Lagerung" von Viroiden in der Pflanze zu erklären (s. Übersicht Säger, 1982 (11)).

Für genauere Untersuchungen der Replikation von Viroiden in Pflanzenzellen eigneten sich besonders Protoplasten. Sie konnten aus Mesophyllgewebe der Wirtspflanze Tomate gewonnen werden (13). Wurden sie mit Viroid-RNA *in vitro* inokuliert, so vermehrten sie diese, was durch Einbau von ^3H -Uridin in eine neu entstandene RNA-Bande und mittels Biotest durch das Ansteigen der Infektiosität der aus den Protoplasten extrahierten Nukleinsäuren nachgewiesen werden konnte (14). Isolierte und anschließend *in vitro* mit Viroid-RNA infizierte Protoplasten eigneten sich zudem für Versuche mit Hemmstoffen, die zelluläre RNA-Polymerasen in ihrer Aktivität beeinflussen (15). Die Versuche mit alpha-Amanitin zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Viroidneusynthese. Bei einer Konzentration von 50 μg alpha-Amanitin pro ml Protoplastenmedium (ca. 10^{-5} M) wurde die Viroidsynthese zu 75% gehemmt, dies entsprach einer Hemmstoffkonzentration von ca. 2×10^{-8} M in der Pflanzenzelle. Vergleiche mit der Synthesehemmung von zellulären RNAs und die Ergebnisse aus Hemmstoffversuchen in animalen Zellsystemen führten zu der Folgerung, daß die DNA-abhängige RNA-Polymerase II, die im

Nukleoplasma lokalisiert ist und mRNA bzw. die mRNA-Vorläufer (hn-RNA) transkribiert, an der Neusynthese von Viroid-RNA beteiligt ist. Ob ebenso die weniger alpha-Amanitin-empfindliche RNA-Polymerase III bei der Viroidvermehrung beteiligt ist, konnte mit diesen Versuchen nicht geklärt werden, da höhere Konzentrationen von alpha-Amanitin zum schnellen Absterben der Protoplasten führten.

Die Etablierung von pflanzlichen, viroidinfizierten Zellkulturen und ihre Kultivierung wurde von Aaron Zelzer et al. (16), Hans-Peter Mühlbach und Heinz L. Sängler (17) sowie von L. Marton et al. (18) 1981 und 1982 beschrieben. Sowohl von Kultursorten der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*), als auch von ihren Wildformen (*L. peruvianum* bzw. *S. demissum*) konnten Kallus- und Suspensionskulturen gewonnen und kultiviert werden. Im Gegensatz zu Zellkulturen, die mit Virus infiziert sind, verlieren die viroidinfizierten Zelllinien das Pathogen nicht, sondern vermehren die Viroid-RNA in ihren Tochterzellen weiter. Auch zeigten diese Zellkulturen im Vergleich zu aus gesunden Kontrollpflanzen gewonnenen Kulturlinien keine offensichtlichen cytopathischen Effekte. In der Untersuchung der Viroidreplikation eigneten sich diese permanent infizierten Zellkulturen zur Gewinnung und Aufreinigung größerer Mengen von transkriptionsaktiven Zellkernen (19). Diese Zellkerne konnten dann für *in vitro*-Transkriptionsversuche eingesetzt werden, um den Einfluß von Hemmstoffen auf die Viroidvermehrung am Ort ihrer Replikation genauer zu untersuchen (20).

Viroid- und viroidkomplementäre RNAs (21, 22, 23), aus permanent infizierten Zellkulturen und aus infiziertem Pflanzengewebe isoliert, wurden durch molekulare Hybridisierung mit radioaktiv markierter Viroid-RNA, nachgewiesen und charakterisiert. Dies führte zum Nachweis von linearen, viroidkomplementären Ribonukleinsäuren, die analog zu viralen RNAs als (-)Viroid-RNAs bezeichnet wurden und zum Teil mehrfache Einheitslänge besaßen (24, 25, 26). Branch und Robertson zeigten durch molekulare Hybridisierung mit PSTVd-cDNA, daß auch geringe Mengen von linearen, oligomeren Molekülen mit Viroidsequenz ("(+)" Polarität) in infiziertem Pflanzengewebe nachweisbar

waren. Sie formulierten ein Modell, in dem alle diese langen, linearen Viroidmoleküle als Zwischenprodukte der Replikation auftreten (27):

Das zirkuläre Viroidmolekül wird von RNA-Polymerasen in mehreren Umrundungen in einem "rolling-circle"-ähnlichen Mechanismus in eine lange, lineare, einzelsträngige RNA mit viroidkomplementärer Sequenz überschrieben. Davon wird direkt oligomere, lineare Viroid-(+)RNA kopiert. Aus diesen langen Strängen mit mehrfach aneinander gereihter Viroidsequenz wird durch exaktes Schneiden eine lineare Einheit herausgetrennt, deren Enden werden zu einem ringförmigen RNA-Molekül verknüpft. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß bereits die lange (-)RNA auf Einheitslänge zurückgeschnitten und dann zirkularisiert wird. In einem zweiten "rollenden Zirkel" entstehen erst die langen, linearen, oligomeren Viroidmoleküle, die dann geschnitten und ligiert werden; beide Mechanismen scheinen bei der Replikation von unterschiedlichen Viroiden auch verwirklicht zu sein (siehe Übersicht Sänger, H. L. (28)).

Mina Tsagris et al.(29) konnten zeigen, daß Extrakte, aus hochgereinigten Zellkernen von gesunden Kartoffelzellen gewonnen, in der Lage sind, die für die "Viroid-Reifung" erforderlichen Schneide- und Verknüpfreaktion durchzuführen. Wurden mit Hilfe der SP6-Polymerase *in vitro* lineare, oligomere, radioaktiv markierte Viroid-RNAs hergestellt und diese zu nukleären Extrakten gegeben, entstanden zirkuläre Viroide mit genauer Einheitslänge.

Der Vermehrungszyklus von PSTVd, dem Erreger der Kartoffelspindelknollensucht, könnte folgendermaßen ablaufen:

Die zirkuläre Viroid-RNA wird im Zellkern von der wirtseigenen DNA-abhängigen RNA-Polymerase II in einer RNA-RNA Transkription in komplementäre oligomere (-)RNA durch einen "rolling-circle"-ähnlichen Mechanismus überschrieben. Diese lange RNA dient als Matrize für eine weitere Transkription in oligomere (+)RNA. Sehr schnell werden lineare Viroideinheiten herausgeschnitten und die Enden zu einem ringförmigen Molekül verschlossen. Das "reife Viroid" wird dann im Nukleolus gelagert (30), möglicherweise mit Histonen komplexiert (31).

2. PROBLEMSTELLUNG

Die komplementäre Viroid-RNA, deren Nachweis sowohl in Blattgewebe als auch in permanent infizierten Pflanzenzellkulturen durch molekulare Hybridisierung gelang, wurde als Replikationszwischenprodukt interpretiert. In infizierten Tomatenpflanzen konnte sie jedoch erst 14 Tage nach Inokulation nachgewiesen werden (27). In *in vitro* inokulierten Protoplasten ließ sich bereits nach 48 Stunden der Einbau von ^3H -Uridin in die neuentstandene Viroid-RNA beobachten. Wurde die extrahierte Gesamtnukleinsäure von *in vitro* inokulierten Protoplasten im hochempfindlichen Biotest auf Tomatenpflanzen übertragen, nahm die Infektiosität bereits 36 Stunden nach Protoplasteninokulation zu (14). Für die Inokulation von Protoplasten ist jedoch eine hohe Konzentration an Viroid-RNA notwendig. Die nicht aufgenommene und außen an den Protoplasten haftende Viroid-RNA erschwert den Nachweis der in sehr geringen Mengen neusynthetisierten Viroid-RNA. Um die sich unmittelbar an die Inokulation anschließenden "frühen" Phasen der Viroidreplikation untersuchen zu können, war ein Verfahren für den effizienten Transfer von geringen Mengen PSTVd in Protoplasten notwendig. Die von O. Faustmann (65) etablierte Technik der Liposomen-vermittelten Inokulation von *Solanum tuberosum* Protoplasten sollte für die Wildkartoffel *Solanum demissum* modifiziert werden; dies umfaßte die Fusion der Plasmamembran mit Liposomen sowie die anschließende Regeneration der inokulierten Protoplasten zu teilungsaktiven Zellen. Es mußten Methoden entwickelt werden, um das Auftreten von Replikationszwischenstufen in frisch inokulierten Protoplasten zu analysieren und postulierte Komplexe aus zirkulärem Viroid und den dazu komplementären RNA-Molekülen zu isolieren. Damit sollte die Viroidreplikation in Protoplasten im zeitlichen Verlauf der Infektion verfolgt werden.

Im Gegensatz zu vielen Pflanzenviren werden Viroide nicht nach einigen Vermehrungszyklen aus wachsenden Zellkulturen verdrängt, sondern ständig weitervermehrt, die Zellen bleiben permanent infiziert, können über Jahre hinweg kultiviert (16, 17, 18) und für die Isolierung von transkriptionsaktiven Zellkernen, von Viroid-Replikationsintermediären oder von Viroid-Pro-

tein-Komplexen verwendet werden. Ebenso läßt sich der Einfluß der Viroidinfektion auf zelluläre Vorgänge wie Transkription, Translation oder DNA-Replikation untersuchen, sowie umgekehrt die Frage, ob die kontinuierliche Replikation in der Zellkultur über Jahre hinweg das "Viroidgenom" beeinflusst. Die PSTVd-Replikation wird ausschließlich von zellulären RNA-Polymerasen durchgeführt. Von diesen nimmt man an, daß sie im Gegensatz zu DNA-Polymerasen keine Korrektur-Lese-Aktivität ("proof-reading") besitzen; Fehler im Laufe der Viroidsynthese würden dann zu veränderter Viroidnachkommenschaft führen. Hier boten sich die Untersuchung auf Infektiosität und Pathogenität sowie die Sequenzanalyse der PSTVd-Nachkommenschaft aus Zellkulturen an, die verschieden lang mit PSTVd infiziert waren.

3. MATERIALIEN

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad p.A. und stammen, wenn nicht besonders vermerkt, von Merck, Darmstadt. Die Bezugsadressen der anderen Hersteller sind:

Amersham, 3300 Braunschweig

BioRad, 8000 München

Boehringer Mannheim, 6800 Mannheim

Gibco/BRL, 7514 Eggenstein

NEN, 6072 Dreieich

Pharmacia, 7600 Freiburg

Renner, 6701 Dannstadt

Roth, 7500 Karlsruhe

Sigma, 8024 Deisenhofen

3.1.1 Radioaktiv markierte Reagentien

Na¹²⁵I (IMS 30), alpha[³²P]-UTP (PB 20383), gamma[³²P]-ATP (PB 10218), alpha[³²P]-desoxy-ATP (PB 10384) wurde von Amersham, Braunschweig bezogen.

3.1.2 Nukleotide

Die Ribo- und Desoxyribonukleotide wurden bei Pharmacia, Freiburg und Boehringer, Mannheim bestellt.

3.1.3 DNA-Oligonukleotide

Der zum T7-Promotor komplementäre Primer stammt von Boehringer, Mannheim. Die übrigen DNA-Oligonukleotide wurden freundlicherweise in der Abteilung von Prof. Oesterheld, MPI für Biochemie, Martinsried, synthetisiert, die Tritylschutzgruppen wurden 20 min bei RT in 80% Essigsäure abgespalten. Das

Pellet der Ethanolfällung wurde gelelektrophoretisch auf einem 15%-Sequenzgel mit den Maßen 40x25x0,15 cm aufgetrennt. Die Oligonukleotide konnten mit Hilfe einer DC-Fluoreszenzplatte im langwelligen UV-Licht direkt sichtbar gemacht werden; die längste Bande wurde ausgeschnitten und mit Isotachophorese eluiert. Die gewonnenen "Primer" wurden in einer Konzentration von 1 OD/ml bei -20°C aufbewahrt.

Bezeichnung	Sequenz (3'- 5')	Bindungsstelle im PSTvd
P1	AGGTTTCCCGGGG	104-91
KL	CCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAAAAGG	91-125
SE 2	GCCGCTGGGCACTCCCACCGTCCTTTTTGCCAG	147-113
SE 3	GAGGTCAGGTGTGAACCACA	41-22
SE 5	TGTTTCCACCGGGTAGTAG	275-256

3.1.4 Längenmarker

Als Längenmarker wurden die Restriktionsfragmente verwendet, die durch Hinf I-"Verdau" des Plasmids pBR322 entstehen. Für "Northern Hybridisierung" wurden die mit Phosphatase behandelten DNA-Fragmente am 5'Ende mit [³²P] durch Polynukleotidkinase markiert. Die Fragmente waren 75, 154, 220, 221, 298, 344, 396, 506, 517 und 1631 Nukleotide lang.

3.1.5 Plasmid-DNA

Die beiden Plasmide pHa106 und pBBs106 wurden freundlicherweise von Dr. M. Tabler zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Derivate der Plasmide pGEM-1 und pSP64. Die Plasmide wurden in den *E. coli*-Stämmen JM83 und JM103 vermehrt.

3.1.6 PSTVd-RNA

Die als Längenmarker, für Iodierung sowie zur Inokulation von Protoplasten benutzte, hoch aufgereinigte PSTVd-RNA besaß die Sequenz des "type strain" und wurde freundlicherweise von Frau K. Ramm, Abt. Viroidforschung, MPI für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

3.1.7 Enzyme

Restriktionsenzyme, Phosphatase, Polynukleotidkinase, Ligase, M-MLV-Reverse Transkriptase und SP6-Polymerase wurden von Boehringer, Mannheim, Gibco/BRL, Eggenstein, New England Biolabs, Schwalbach und Renner, Dannstadt bezogen und nach Vorschrift eingesetzt.

3.2 Geräte

Szintillationszähler TriCarb 460C Automatic, Canberra Packard, Frankfurt;
Vortex Genie, Scientific Instruments, New York;
Vibrax-VBR, Janke und Kunkel, Staufen;
Mini Shaker, Kühner, Basel;
Lichtinkubator VT PH500, Haereus/Vötsch, Bahlingen;
Schüttelschrank KF4, Infors, München;
Wärmeinkubatorschrank für Hybridisierung, Bachofer, Reutlingen;
Trockenschrank, Haereus, Hanau;
UV-Transilluminator Cromato-Vue 254, 366 nm, Ultra-Violet Products, San Gabriel, CA, USA.

Zentrifugen:

Eppendorf Centrifuge 5414;
Sigma 2MK und Minifuge-2, Haereus/Christ, Osterode;
Speed-Vac Concentrator, Uni Equip, Bachofer, Reutlingen;
Kühlzentrifuge JM-21 und Ultrazentrifuge LB 8-70, Beckman, München.

3.3 Sonstiges

Die Röntgenfilme stammten von Fuji (RX) und Kodak (XAR), die Verstärkerfolien von DuPont (Quanta III, Lightning Plus).

4. METHODEN

Das Kapitel "Methoden" ist in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt umfaßt Methoden, die für die pflanzlichen Zellkulturen benötigt wurden, im zweiten Abschnitt werden Methoden beschrieben, die im Umgang mit Nukleinsäuren verwendet wurden, der dritte Abschnitt behandelt molekularbiologische Methoden, wie z.B. Klonierung, Plasmidisolierung und -sequenzierung.

Die meisten Lösungen und Puffer werden in Spalten aufgetrennt dargestellt, in der Reihenfolge:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Menge</u>	<u>Konzentration</u>
--------------------	--------------	----------------------

Erster Abschnitt: Methoden für Pflanzenzellkulturen

4.1 Zellkulturen der Wildkartoffel *Solanum demissum*

Es wurden die Zelllinien M316 und M384 verwendet; diese Kalluszellen waren an den Schnittstellen von Stengelsegmenten der Wildkartoffel *Solanum demissum* entstanden. Die Zelllinie M316 entstammt systemisch mit PSTVd type strain infizierten Pflanzen.

Kalluszellen, die von nicht infizierten Pflanzen derselben Wildkartoffelart stammen, tragen die Bezeichnung M384.

Protoplasten der Zelllinie M384 wurden *in vitro* mittels Liposomenfusion mit PSTVd type strain inokuliert und zu teilungsaktiven Suspensions- und Kalluskulturen regeneriert. Diese Zelllinie erhielt die Bezeichnung RK46.

Medium M 240 (in mg/l):

Makroelemente

NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
KH_2PO_4	170
$\text{MgSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	370

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440
--	-----

Mikroelemente

Na_2EDTA	37,3
$\text{Fe}(\text{SO}_4) \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8

H_3BO_3	6,2
-------------------------	-----

$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
--	------

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
--	-----

KI	0,83
----	------

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,25
---	------

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
--	-------

$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
--	-------

Mit KOH wird der pH auf 5,8 eingestellt.

Vitamine

Nicotinsäure	0,5
Pyridoxin/HCl	0,5
Adeninsulfat	40
Kokosnußwasser	25 ml

Zucker

Saccharose	30.000
------------	--------

Hormone

2,4-D	1
-------	---

Das fertige Medium wird durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wird das Medium auf RT erwärmt.

Für die Kultur von Kalluszellen auf festem Nährmedium werden 5 g Agar (Difco, Bacto Agar) in 1 l Medium gegeben und 20 min bei 121°C autoklaviert. 25 ml Kokosnußwasser werden erst nach dem Abkühlen auf ca. 60°C zugegeben. Das Medium wird in Portionen von 40 ml in sterile Agarkulturdöschen (Greiner, PS-Verp. Dose, kobaltsteril, 967161) gegossen.

Folgende Stammlösungen für das Medium können hergestellt und bei 4°C aufbewahrt werden:

Makroelemente 100x, CaCl_2 -Lösung 1 M, Eisen/EDTA 100x, KI 0,83 mg/ml, Nikotinsäure 0,1 mg/ml, Pyridoxin/HCl 0,1 mg/ml, Kokosnußwasser deproteinisiert und steril (Gibco-BRL), 2,4-D 0,5 mg/ml.

Die Mikroelemente (außer Eisen/EDTA und KI) werden als 1000x konzentrierte Stammlösung bei -20°C aufbewahrt.

4.1.1 Kalluskulturen

Die Zellen werden durch monatliches Umsetzen auf mit Agar verfestigtes Medium M 240 weiterkultiviert. Sie werden in einem Lichtthermostaten VT-PH5/500 (Haereus-Vötsch, Bahlingen) 16 h lang bei 26°C und ca. 3000 Lux, und 8 h bei 21°C im Dunkeln inkubiert.

4.1.2 Suspensionskulturen

Die Suspensionszellen der Zelllinien M384, M316 und RK46 werden in 500 ml Schüttelkulturflaschen (Bellco, 2543-00500) bei 26°C und 120 Upm im Dunkeln in Schüttelschränken KF4 (Infors) kultiviert. Nach 7 Tagen wird die Zellsuspension von 100 ml mit Medium M 240 verdünnt. Der Inhalt einer Kulturflasche wird über ein steriles Edelstahlsieb (Porenweite ca. 1 mm), das auf einen Glastrichter aufgesetzt ist, gefiltert. Die abgetrennten Kallusbröckchen werden entfernt. Das Filtrat wird mit Medium M 240 auf ein Volumen von 200 ml verdünnt und die Suspension anschließend auf zwei frische Kulturflaschen verteilt.

4.1.2.1 Bestimmung von Wachstumscharakteristika für Suspensionszellen

Bestimmung des gepackten Zellvolumens (PCV):

- (1) Aus den Schüttelkulturflaschen wird 1 ml Zellsuspension entnommen, dies erfolgt mit einer Pipette, die eine große Ansaugöffnung besitzt. Die Suspension wird in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert.

- (2) Die Proben werden 10 min bei 2.000 Upm zentrifugiert und das gepackte Zellvolumen durch Vergleich mit Zentrifugenröhrchen bestimmt, die mit definierten Volumina Wasser gefüllt waren.

Bestimmung des mitotischen Indexes (M.I.)

- (1) Nach der Bestimmung des gepackten Zellvolumens wird das überstehende Medium vorsichtig abgekippt. Die pelletierten Zellen werden in Plasmolytikum im Volumen des doppelten gepackten Zellvolumens resuspendiert und in ein 12 ml Greinerröhrchen überführt. Nach 10 min werden die plasmolysierten Zellen sedimentiert (10 min; 2.000 Upm; RT).
- (2) Das Sediment nimmt man in 2-3 Volumen (PCV) Enzymlösung für Protoplasten (siehe Seite 19) auf und inkubiert es 30 min bei 30°C, die Protoplasten werden anschließend sedimentiert (5 min; 500 Upm; RT).
- (3) Sie werden in 0,3 M Mannit/45% Essigsäure-Lösung 20 min bei RT "fixiert". Nach erneutem Zentrifugieren werden die Protoplasten in 45% Essigsäure zweimal "gewaschen".
- (4) Die Waschlösung wird bis auf ca. 200 ul abgenommen, die Protoplasten werden im Rest resuspendiert und auf saubere, fettfreie Objektträger getropft.
- (5) Nach dem Trocknen werden die Proben auf den Objektträgern entwässert:

2x5 min	70% Ethanol
1x10 min	95% Ethanol
- (6) Nach erneutem Trocknen werden die Protoplasten 20 min in einer 5% Giemsalösung (Azur-Eosin-Methylblau, Merck 0055364) in 10 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,5) gefärbt, gewässert und getrocknet.
- (7) Pro Zeitwert der Wachstumsbestimmung werden mindestens 500 Zellkerne auf mitotische Figuren (kondensierte Chromosomen) untersucht, das Verhältnis der Mitosen zur Gesamtzahl der untersuchten Zellkerne ergibt in Prozent den mitotischen Index.

4.1.3 Protoplastenkulturen

4.1.3.1 Präparation von Protoplasten aus Suspensionszellen

Suspensionszellen sind eine ideale Quelle für die Herstellung großer Mengen pflanzlicher Protoplasten. Die Zellen werden durch Zentrifugation konzentriert, die Zugabe von osmotisch aktiven Lösungen bewirkt eine Verkleinerung des Zellvolumens und die Ablösung der Plasmamembran von der starren Zellwand. Die Zellwand kann anschließend durch Cellulose und Pektin abbauende Enzyme entfernt werden. Durch den Einsatz von hochaktiven Enzymen lassen sich in zwei Stunden einige Millionen Protoplasten gewinnen. Werden die Protoplasten anschließend in ein passendes Nährmedium überführt, können sie wieder eine Zellwand aufbauen und durch Zellteilungen zu mehrzelligen Mikrokalli regenerieren. Bei einigen Pflanzenspezies ist es möglich, aus einzelnen Protoplasten wieder differenzierte Pflanzen zu erhalten.

Materialien:

10 ml Kunststoffpipetten, einzeln steril verpackt (Renner, Dannstadt); 50 ml-Falconröhrchen steril (Becton/Dickinson, 2070); 12 ml Zentrifugenröhrchen durchsichtig, einzeln steril verpackt (Greiner, 191161); Petrischalen 145/20 (Greiner, 639169); 60/15 (Greiner, 628160).

Stahlsiebe von 63 µm Maschenweite (Saulas, Paris) werden auf 100 ml-Bechergläser gesetzt und, mit Aluminiumfolie verschlossen, durch Hitze sterilisiert.

Plasmolytikum:

Mannit	7,3 g	(0,4 M)
K-Citrat	1,62 g	(50 mM)
CaCl ₂ Lsg. (1 M)	0,2 ml	(2 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Der pH wird mit Zitronensäure auf 4,8 eingestellt.

Enzymlösung:

1 g Cellulase Onozuka-RS (Yakult Pharmaceutical, Nishinomyiya, Japan) und 0,1 g Pectolyase YC 23 (Seishin Pharmaceutical, Chiba, Japan) werden in 100 ml Plasmolytikum gelöst. Die Enzymlösung wird ca. 1 h leicht gerührt und anschließend zentrifugiert (5 min; 5.500 Upm; RT), um vorhandene unlösliche Schwebstoffe zu entfernen.

Alle Lösungen werden durch 0,22 µm-Filter (Millipore, Millex-GS; Nalgene, S-CN) sterilfiltriert.

Durchführung:

- (1) Die Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die benötigten Suspensionszellen werden aus den Schüttelkulturflaschen in sterile 50 ml-Falconröhrchen überführt und sedimentiert (10 min; 2.000 Upm; RT). Das "gepackte Zellvolumen" (PCV) in den Röhrchen läßt sich mit der aufgedruckten Graduierung leicht bestimmen. Das überstehende Kulturmedium wird vorsichtig abgegossen.
- (2) Zu jeweils einem Volumen gepackter Zellen werden 2-3 Volumen Plasmolytikum pipettiert, das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und 20 min lang mit 80-100 Upm auf dem Schüttelinkubator bei RT geschüttelt. Die plasmolysierten Zellen werden erneut zentrifugiert (10 min; 2.000 Upm; RT), der Überstand wird entfernt.
- (3) Die pelletierten Zellen werden in Enzymlösung resuspendiert. Die zugegebene Volumenmenge beträgt wiederum das 2-3 fache Volumen des gepackten Zellvolumens.
- (4) Die Zellen werden in die großen Petrischalen (145/20) überführt, diese mit Nescofilm verschlossen und bei 30°C 30 min inkubiert. Danach läßt sich mit dem Mikroskop der Zustand des Zellwandverdaus kontrollieren. Meistens sind noch viele Protoplasten in Zellaggregaten eingeschlossen, sie können durch langsames Schütteln (5 min; 40 Upm; 30°C) freigesetzt werden.
- (5) Zur Abtrennung der Protoplasten von noch unverdauten Zellaggregaten wird die Lösung über die sterilen Stahlsiebe (63 µm) pipettiert.

- (6) Die Protoplastensuspension wird aus den Bechergläsern in 14 ml-Greiner-Zentrifugenröhrchen überführt und pelletiert, (5 min; 500 Upm; 15°C).
- (7) Die überstehende Enzymlösung enthält noch Zellwandtrümmer und wird vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wird in Plasmolytikum resuspendiert, die Protoplasten werden durch erneutes Zentrifugieren (5 min; 500 Upm; 15°C) von weiteren Verunreinigungen befreit.
- (8) Die "gewaschenen" Protoplasten werden in einer definierten Menge Plasmolytikum gelöst und es wird ein kleines Aliquot entnommen. Die Protoplastendichte wird mittels eines Hämozytometers bestimmt und die Gesamtausbeute aus Dichte und Volumen der Protoplastenlösung berechnet. Die Protoplasten können durch Plasmolytikum weiter verdünnt oder durch Zentrifugation konzentriert und für die folgenden Versuche eingesetzt werden.

4.1.3.2 Inokulation von Protoplasten

Die Protoplastenmembran stellt für die Aufnahme von Nukleinsäuren in die Zelle eine Barriere dar; sie kann durch die kurzzeitige Umstrukturierung der Membran mithilfe eines starken elektrischen Feldes (Elektroporation (32)) oder durch Zugabe von destabilisierenden chemischen Substanzen aufgebrochen werden. Die gebräuchlichste Substanz ist Polyethylenglycol (PEG) in Kombination mit Ca^{2+} -Ionen (33). Die Nukleinsäure wird direkt oder in Membranvesikel verpackt zu den Protoplasten gegeben und die Aufnahme der Nukleinsäure in die Zellen durch Zugabe einer PEG-Lösung angeregt. Bei der Aufnahme von möglichst geringen Mengen Inokulum, die zum Nachweis der in geringen Mengen neu synthetisierten PSTVd-RNA notwendig ist, erwies sich die Verpackung in künstliche Membranvesikel (Liposomen) als äußerst effizient. Viroid-DNA oder durch SP6-Polymerase transkribierte Viroid-RNA kann für eine Inokulation von Protoplasten auch direkt eingesetzt und die zeitaufwendige, technisch anfällige Liposomenpräparation damit umgangen werden.

Inokulation mit in REV-Liposomen eingehüllter PSTVd-RNA

PEG/8p_m-Lösung:

PEG 4000 (Serva)	26 g	(26%)
8p _m	ad 100 ml	

Das PEG wird in ca. 50 ml Protoplastenmedium 8p_m über Nacht bei RT stehend gelöst und auf das Volumen von 100 ml verdünnt.

"high Ca/high pH-Puffer"(34):

Glycin-Lsg.(2 M)	2,5 ml	(50 mM)
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,74 g	(50 mM)
Mannit	7,3 g	(0,4 M)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Der pH-Wert 10,5 wird mit NaOH eingestellt.

Protoplastenmedium 8p_m (siehe Regeneration von Protoplasten)

Durchführung:

- (1) Die isolierten Protoplasten werden in die Greinerröhrchen sedimentiert (5 min; 500 Upm; 15°C). Das überstehende Plasmolytikum wird vorsichtig abgenommen. Die Protoplasten werden im restlichen Plasmolytikum durch leichtes Schütteln resuspendiert.
- (2) Die benötigte Menge Liposomensuspension (10 µl für 1x10⁶ Protoplasten) wird mit Liposomenpuffer auf 100 µl verdünnt.
- (3) Diese Lösung wird zu den Protoplasten pipettiert, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wird das Volumen durch Zugabe von Plasmolytikum auf 1 ml gebracht.
- (4) 1 ml der PEG Lösung wird hinzupipettiert. Beide Lösungen werden durch leichtes, mehrmaliges Schwenken vorsichtig gemischt, 15 min bei 30°C im Wärmeschrank liegend inkubiert, ab und zu vorsichtig geschwenkt.
- (5) Zur Protoplasten/PEG-Mischung werden langsam 8 ml "high Ca/high pH-Puffer" hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend werden die Protoplasten sedimentiert (10 min; 500 Upm; 20°C).

- (6) Der Überstand wird abgenommen, die sedimentierten Zellen werden in Protoplastenmedium resuspendiert und erneut sedimentiert (10 min; 500 Upm; 20°C). Der Überstand wird entfernt.
- (7) Das Sediment wird in 5 ml Protoplastenmedium 8p_m resuspendiert, die Dichte der Protoplasten mit einem kleinen Aliquot im Hämocytometer bestimmt, die Protoplasten werden mit Protoplastenmedium 8p_m auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und ausplattiert.

Inokulation mit SP6-transkribierter PSTVd-RNA

PEG-Lösung:

PEG 4000 (Serva)	30 g	(30% W/V)
MES	0,2 g	(0,2%)
Mannit	7,3 g	(0,4 M)
CaCl ₂ -Lsg. (1 M)	2 ml	(20 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Der Ansatz bleibt ÜN bei RT stehen. Nach der Sterilfiltration stellt sich in der Lösung ein pH-Wert von 5,8-6,5 ein.

MES= Morpholino-ethan-sulfonsäure

Ficoll-Lösung:

Ficoll 400	30 g	(30% W/V)
Plasmolytikum	ad 100 ml	
(s.: 4.1.3.1)		

Das Ficoll (Pharmacia) wird ÜN in ca. 30 ml bei RT gelöst und anschließend auf das Volumen von 100 ml gebracht.

Protoplastenmedium 8RP (siehe Regeneration von Protoplasten)

Durchführung:

- (1) Protoplasten (6-8x10⁶ Ppl.) werden in einem Greinerröhrchen sedimentiert und möglichst weitgehend vom überstehenden Plasmolytikum befreit. Zum Pellet werden 15 µg in TE-Puffer (siehe 4.4) gelöste SP6-PSTVd-RNA pipettiert, leicht gemischt und 5 min im Eisbad inkubiert.

- (2) Das Volumen wird durch Zugabe von Plasmolytikum auf 1 ml gebracht, 1 ml der PEG-Lösung wird hinzupipettiert, durch Schwenken vorsichtig hinzugemischt, 15 min bei RT inkubiert und ab und zu vorsichtig geschwenkt.
- (3) Zu der Protoplasten/PEG-Mischung werden 3 ml (zweimal je 1,5 ml im Abstand von 1 min) Protoplastenmedium 8RP hinzupipettiert und vorsichtig gemischt.
- (4) Anschließend werden 5 ml der Ficoll-Lösung zugegeben und durch Kippen der Röhrchen gemischt. Darüber werden 2 ml Protoplastenmedium 8RP geschichtet. Dieser einstufige Gradient wird zentrifugiert (20 min; 500 Upm; 20°C).
- (5) Die intakten Protoplasten konzentrieren sich an der Interphase zwischen Ficoll und Medium und können leicht abgenommen werden (35). Der sedimentierte Zellbruch wird verworfen.
- (6) Die abgenommene Protoplastenbande wird mit Protoplastenmedium 8RP verdünnt und die Dichte der Protoplasten mit einem kleinen Aliquot im Häemocytometer bestimmt. Die Protoplasten werden zur Regeneration in Protoplastenmedium aufgenommen und in Petrischälchen plattiert.

4.1.3.3 Mikroautoradiographie

- (1) Protoplasten werden mit [^{32}P]-markierter SP6-PSTVd-RNA durch Liposomenfusion inokuliert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Inokulation werden Protoplasten aus dem Regenerationsansatz entnommen.
- (2) Die Protoplasten werden wie für die Bestimmung des mitotischen Index behandelt, sie werden fixiert, gewaschen, aufgetropft und entwässert.
- (3) Die trockenen Objektträger werden mit einer Filmemulsion beschichtet (nuclear track emulsion NTB 2, Kodak). Nach einigen Tagen erfolgt die 5-minütige Entwicklung der Emulsion mit Rodinal (Agfa), mit anschließender Fixierung mit 30% Natriumthiosulfat und Spülung mit Leitungswasser.

- (4) Die Zellen werden mit 5% Giemsa gefärbt und mikroskopiert. Die inokulierte Nukleinsäure wird durch die schwarzen Silberkörnchen sichtbar gemacht.

4.1.3.4 Regeneration von Protoplasten

Medium 8p_m (70) (in mg/l):

<u>Makroelemente</u>		<u>Organische Zusätze</u>	
NH ₄ NO ₃	600	Na-Pyruvat	20
KNO ₃	1900	Zitronensäure	40
KH ₂ PO ₄	170	Äpfelsäure	40
MgSO ₄	300	Fumarsäure	40
KCl	300	Fructose	250
		Ribose	250
CaCl ₂ x2H ₂ O	600	Xylose	250
		Mannose	250
<u>Mikroelemente</u>		Rhamnose	250
Na ₂ EDTA	28	Cellobiose	250
Fe(SO ₄) x7H ₂ O	21	Sorbitol	250
		Mannitol	250
H ₃ BO ₃	3		
MnSO ₄ xH ₂ O	10		
ZnSO ₄ x7H ₂ O	2		
KI	0,75		
Na ₂ MoO ₄ xH ₂ O	0,25		
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025		
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025		

Vitamine

m-Inosit	100
Thiamin/HCl	1
Pyridoxin/HCl	1
Nicotinsäure	1
Caseinhydrolysat	250
Ca-Pantothenat	1
Folsäure	0,4
Aminobenzoesäure	0,02
Biotin	0,01
Cholinchlorid	1
Riboflavin	0,2
Ascorbinsäure	2
Vitamin A	0,01
Vitamin D ₃	0,01
Vitamin B ₁₂	0,02
Kokosnußwasser	20 ml

Zucker

Glucose	75.000
---------	--------

Hormone

6-BA	0,1
2,4-D	0,5
NAA	3

Mit KOH wird ein pH-Wert von 5,8 eingestellt.

Medium 8RP (in mg/l):

Makroelemente

KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄	300
CaCl ₂	600

Mikroelemente

Na ₂ EDTA	37,3
Fe(SO ₄) x7H ₂ O	27,8
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ x4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ xH ₂ O	0,25
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025

Zucker

Glucose	75.000
---------	--------

Hormone

6-BA	0,5
2,4-D	1
NAA	0,5

Der pH-Wert von 5,8 wird mit KOH eingestellt.

Vitamine

m-Inosit	200
Thiamin/HCl	1
Pyridoxin/HCl	1
Nicotinsäure	1
Glutamin	750
Ca-Pantothenat	1
Folsäure	0,4
Aminobenzoesäure	0,02
Biotin	0,01
Cholinchlorid	1
Riboflavin	0,2
Ascorbinsäure	2
Vitamin A	0,01
Vitamin D ₃	0,01
Vitamin B ₁₂	0,02

Die Protoplastenmedien werden in doppelter Konzentration hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Sie werden bei Bedarf aufgetaut, mit bidestilliertem Wasser 1:1 verdünnt und durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert.

Zu 1,8 g Agarose (BRL, LMP Agarose 5517UB) wird H₂O bidest gegeben bis ein Gewicht von 100 g erreicht ist. Das Gewicht des Gefäßes wird notiert und die Agarose 10 min bei 121°C autoklaviert. Der Flüssigkeitsverlust wird durch Zugabe von sterilem "Bidest" ausgeglichen. Die sterile Agaroselösung kann bis zum Gebrauch bei RT gelagert werden oder wird in einem Wasserbad auf 40°C abgekühlt.

Doppeltkonzentriertes Protoplastenmedium wird aufgetaut, durch 0,22 µm-Filter sterilisiert, zu gleichen Teilen mit der Agaroselösung gemischt und bei 40°C inkubiert.

Regeneration in submerser Flüssigkultur

- (1) Die Protoplasten werden mit Protoplastenmedium (je nach Versuchsan-satz mit 8p_m oder 8RP) auf eine Konzentration von 3×10^4 Ppl/ml ver-dünnt und zu 4 ml in kleine Petrischalen (Greiner, 628160) pipet-tiert.
- (2) Die Schälchen werden mit Nesco-Film-Streifen umwickelt und stehend bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Der Zustand der Protoplasten kann mit einem Inversmikroskop beobachtet werden.
- (3) Nach vier Wochen werden pro Schälchen 2 ml Regenerationsmedium I zu-gegeben. Das Medium I setzt sich aus 2/3 Protoplastenmedium und 1/3 Medium M 240 zusammen. Die Schälchen werden mit Nesco-Film ver-schlossen und weiter stehend inkubiert.
- (4) Nach weiteren zwei Wochen werden die Zellen in ein größeres Petri-schälchen überführt und mit dem gleichen Volumen Regenerations-medium II verdünnt. Medium II besteht aus 1 Teil Protoplastenmedium und 1 Teil Medium M 240.
- (5) Nach weiteren zwei Wochen (8 Wochen nach Protoplastenpräparation) werden die Zellen in eine große Petrischale (Greiner, 639160) oder in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt und mit gleichem Volumen Medium M 240 verdünnt. Die Gefäße werden mit 60 Upm bei 26°C ge-schüttelt. Nach weiteren zwei Wochen werden die Suspensionszellen mit frischem Medium verdünnt und mit 120 Upm in Schüttelkultur-flaschen (Bellco, 2543-00500) kultiviert.

Regeneration von Protoplasten in agarosehaltigem Medium

Agarose, die bei niedrigen Temperaturen gelöst bleibt, wird in 4facher Endkonzentration in bidestilliertem Wasser gelöst und durch kurzes Autoklavieren sterilisiert. Anschließend wird die flüssige Agarose zu gleichen Teilen mit doppelt konzentriertem Protoplastenmedium vermischt und auf 40°C abgekühlt (36). Protoplasten, in doppelter Konzentration in Protoplastenmedium resuspendiert, werden mit dieser Agaroselösung zu gleichen Teilen gemischt und ausplattiert.

Durchführung:

- (1) Die Protoplasten werden mit Protoplastenmedium zu 3×10^4 Ppl/ml verdünnt. 5 ml davon werden mit 5 ml der Agarose/Protoplastenmedium-Lösung gemischt und in ein Agardöschen (Greiner, PS-Verp. Dose, 967161) pipettiert.
- (2) Zum schnellen Verfestigen der Agarose wird das Döschen in den Kühlschrank gestellt, nach 20 min mit Nesco-Film verschlossen und bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Nach 4 Wochen sind die regenerierenden Mikrocalli mit bloßem Auge sichtbar, ihre Regenerationsrate kann nach weiteren 2-4 Wochen bestimmt werden.
- (3) Für die Bestimmung der Regenerationsrate wird eine Schablone zur Einteilung unter die Döschen gelegt. Die Seitenlänge der Quadrate ist so berechnet, daß im Agardöschen das darüberstehende Medium einem Volumen von 1 ml entspricht. Die regenerierten Mikrocalli, die sich in diesem Quadrat befinden, werden mit Hilfe des Mikroskops gezählt. Die Regenerationsrate kann aus der Dichte der Mikrocalli und der Dichte der ursprünglich plattierten Protoplasten bestimmt werden.
- (4) Nach 6-8 Wochen werden die Mikrocalli "gepickt", sie werden mit einem dünnen, langen Spatel auf ein neues Medium übertragen, das zu gleichen Teilen aus Protoplastenmedium und Medium M 240 besteht, und mit 0,5-0,8% Agarose (BRL, 5510UB) verfestigt wird.
- (5) Nach weiteren 6-8 Wochen werden einzelne Calli auf normalem Kallusmedium M 240 mit 0,5% Agar weiterkultiviert.

4.1.4 Präparation von Liposomen durch nachträgliche Entfernung der Lösungsphase (Reverse-phase evaporated vesicles REV)

In einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöste Lipide umschließen eine hinzupipettierte wässrige Lösung mit ihren hydrophilen Enden (37,38). Durch Ultraschallbehandlung der Mischung bilden sich Micellen aus kleinen Tröpfchen. Durch Anlegen eines Unterdrucks kann die organische Lösungsmittelphase verringert werden. Am sogenannten Schmelzpunkt bricht ein Teil der lipidumhüllten Puffertröpfchen auf, die freigesetzten Lipidmembranen umschließen in umgekehrter Orientierung die noch vorhandenen Micellen, es entstehen Liposomen in wässriger Umgebung. Sie werden nach ihre Entstehung "reverse-phase evaporated vesicles" (REV) genannt. Fraley (39) benutzte auf diese Weise hergestellte Liposomen, um RNA des Tabak-Mosaik-Virus einzuschließen und damit Protoplasten von *Petunia* zu infizieren.

4.1.4.1 Methode nach Fraley:

L-Phosphatidyl-L-Serin (Sigma, P 8518), bereits gelöst, bei -20°C gelagert.

Cholesterin (Sigma, C 3137) 10 mg/ml in Chloroform/Methanol (95/5;V/V) gelöst.

Diethylether p.A., wassergesättigt.

Liposomenpuffer:

Tris/HCl pH 7,5	(5 mM)
EDTA	(0,5 mM)
KCl	(50 mM)
Mannit	(0,4 M)

30% Lsg. Ficoll 400 (Pharmacia), gelöst in Liposomenpuffer.

10% Lsg. Ficoll 400, gelöst in Liposomenpuffer.

Alle Lösungen werden mit Milliporefilter GV 0,22 um sterilfiltriert.

Argon in 10 l-Flasche auf fahrbarem Gestell.

Rotationsverdampfer (Rotavap, Büchi) mit Anschlußschlauch für Zuleitung von Argon und Manometer am Abzugschlauch zur Wasserstrahlpumpe; Wasserbad zum Rotationsverdampfer; Glasröhrchen (10 ml) mit Glasschliff zum Ansatz an den Rotationsverdampfer.

Ultraschallbad Bransonic 220.

Ausschwingrotor SW60/Ti und Polyallomerröhrchen (Beckman, 328874).

Durchführung:

- (1) Die Glasteile mit den zu- und ableitenden Vakuumschläuchen und Sterilfiltern für Gas, die Zentrifugenröhrchen und die Glasröhrchen mit Schliff werden durch feuchte Hitze 20 min bei 121°C sterilisiert. Das Wasserbad des Rotationsverdampfers wird auf 27°C eingestellt. Alle Lösungen bleiben bis zum Gebrauch im Eisbad, alle Tätigkeiten werden möglichst unter sterilen Bedingungen im "Laminair-Flow" durchgeführt.
- (2) Das sterile Glasröhrchen sowie ein steriles 1 ml-Eppendorfgefäß werden mit Argon "geflutet". Ca. 500 µl Phosphatidyl-Serin werden mit einer 1 ml-Plastikspritze aus dem Vorratsgefäß entnommen und in das Eppendorfgefäß überführt. Davon werden 400 µl entnommen und sofort in das Glasröhrchen pipettiert. 200 µl Cholesterinlösung werden hinzupipettiert. Das Glasröhrchen wird an den Rotationsverdampfer angeschlossen und das Lösungsmittel unter reduzierter Atmosphäre bis zur Trockene abgedampft (15-20 min; -0,9 bar; Rotationsstufe 10). Zuletzt wird der Unterdruck durch Zugabe von Argon ausgeglichen.
- (3) Die trockenen Lipide werden in 600 µl wassergesättigtem Ether (obere Phase!) erneut gelöst. Die als getrocknetes Pellet vorliegende Nukleinsäure wird in 175 µl Liposomenpuffer aufgenommen, gelöst und bei 0°C auf Eis inkubiert. Die beiden Lösungen werden zusammenpipettiert. Durch Schütteln entstehen kleine Tröpfchen, die Lösung erscheint trüb.

- (4) Das Glasröhrchen wird im auf 0°C abgekühlten Ultraschall-Wasserbad 10-15 sek behandelt. Das Röhrchen wird an den Rotationsverdampfer angesetzt, durch die Wasserstrahlpumpe wird vorsichtig Unterdruck angelegt, gesteuert durch Zugabe von Argon. Falls das Glasröhrchen zum "Vortexen" von der Apparatur abgenommen werden muß, wird es vorher mit Argon "geflutet".
- (5) Zunächst wird der Ether für 15 min mit einem Unterdruck von -0,3 bar vorsichtig abgesaugt. Die Tröpfchensuspension nimmt langsam eine gelartige Konsistenz an. Sobald sich kleine Klümpchen bilden, wird das Röhrchen geflutet, abgenommen und die Klümpchen werden durch vorsichtiges Vortexen (Stufe 3-5) erneut in Suspension gebracht.
- (6) Der Unterdruck wird auf -0,45 bar gesteigert und 15 min lang konstant gehalten. In dieser Zeitspanne wird die Ether-dominierende Phase in eine Puffer-dominierende, wässrige Phase überführt. Bei Klümpchenbildung in der Präparation wird der Unterdruck sofort durch Zugabe von Argon ausgeglichen und solange vorsichtig gevortext, bis die Klümpchen wieder in Suspension gehen, dann wird erneut Unterdruck bis -0,45 bar angelegt.
- (7) In das Glasgefäß werden 165 µl Liposomenpuffer gegeben und die entstehenden Klümpchen durch starkes Vortexen resuspendiert. Der Unterdruck wird auf -0,75 bar erhöht.
- (8) Falls keine erneute Klümpchenbildung erfolgt, kann der Unterdruck zur Entfernung des restlichen Ethers auf -0,9 gesteigert werden. Nach ca. 10 min ist die Liposomenpräparation beendet.

Trennung von Liposomen und nicht eingebauter Nukleinsäure

- (1) Zur Liposomenpräparation werden nochmals 165 µl Liposomenpuffer in das Glasröhrchen gegeben, geschüttelt und 500 µl 30% Ficoll-Lösung dazugemischt. Die entstandene 15% Ficoll-Lösung wird in das mit Argon gefüllte Zentrifugenröhrchen überführt, auf diese Lösung werden 2 ml der 10% Ficoll-Lösung und darüber 1 ml Liposomenpuffer vorsichtig gelagert.
- (2) Dieser Stufengradient wird 30 min bei 30.000 Upm und 5°C "ultra-zentrifugiert". Die Liposomen sammeln sich an der Interphase von 10%

Ficoll und Liposomenpuffer und können mit einer Pasteur- oder Eppendorfpipette abgenommen werden. Die nicht eingebauten Nukleinsäuren verbleiben im 15% Ficoll am Boden des Zentrifugegefäßes.

- (3) Die intakten Liposomen werden in einem sterilen, mit Argon gefüllten Eppendorfgefäß bei 5°C im Kühlschrank gelagert. Sie konzentrieren sich über Nacht im Reaktionsgefäß erneut in einer Bande und können für mehrere Infektionsversuche verwendet werden.

4.1.4.2 Modifikation nach Makins

J. F. Makins (40) schlug zur Verbesserung des technisch anfälligen Herstellungsprozesses vor, das organische Lösungsmittel Ether durch eine Mischung von 67,5 Volumenprozent Ether und 32,5% Chloroform zu ersetzen. Die Dichte dieses Lösungsmittels entspricht der Dichte der wässrigen Phase und erleichtert dadurch die Bildung und Stabilität von gleichgroßen Micellen. Daneben sollen die für die Umhüllung der Nukleinsäuren erforderlichen Lipide von den für die spätere Außenschicht notwendigen getrennt werden. Da sich kleine Micellen leichter öffnen als große, werden die zur Bildung der äußeren Schicht der Doppelmembran vorgesehenen Lipidmicellen längere Zeit mit Ultraschall behandelt. Die beiden Präparationsteile werden vereint, die organische Phase wird durch Unterdruck langsam entzogen.

Diese Modifikationen bewirkten keine Erhöhung der Einbaurate, die Liposomenherstellung war jedoch weniger anfällig und es wurden reproduzierbare Ergebnisse erzielt.

Veränderte Lösungen:

Liposomenpuffer:

Tris/HCl pH 7,0	10 mM
EDTA	0,1 mM
KCl	50 mM
Mannit	0,4 M

Diethylether p.A./Chloroform p.A.-Gemisch: 67,5/32,5 (V/V)

Durchführung:

- (1) Zwei sterile Glasröhrchen werden mit Argon gefüllt und mit A und B gekennzeichnet. In ein steriles, ebenfalls mit Argon gefülltes Eppendorfgefäß werden 500 μ l Phosphatidyl-Serin gegeben und davon je 200 μ l in die Glasröhrchen überführt. Dazu kommen je 100 μ l Cholesterinlösung. Die Lösungsmittel werden mit dem Rotationsverdampfer entzogen.
- (2) Die trockenen Lipide werden in jeweils 300 μ l der kurz vor Gebrauch hergestellten und im Eisbad inkubierten Diethylether/Chloroform-Mischung gelöst.
- (3) Die Nukleinsäure wird in 75 μ l Liposomenpuffer gelöst. In das Glasröhrchen B werden 100 μ l Liposomenpuffer pipettiert. Es wird stark geschüttelt und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. In das Glasröhrchen A wird die gelöste Nukleinsäure (in 75 μ l Liposomenpuffer) pipettiert, stark geschüttelt, aber nur 15 sek mit Ultraschall behandelt. Anschließend wird die Lösung aus Röhrchen B zur Lösung in Röhrchen A gegeben. Die Lösungen werden 1 min mit dem Vortexmischgerät (Stufe 3) gemischt.
- (4) Am Rotationsverdampfer (Rotationsstufe 10) wird bei einem Unterdruck von -0,4 bar 10 min das Ether/Chloroform-Gemisch langsam abgesaugt.
- (5) Der Unterdruck wird auf -0,6 bar gesteigert und für weitere 10 min konstant gehalten; sobald sich kleine Klümpchen bilden, werden sie durch vorsichtiges Vortexen (Stufe 3-5) erneut in Suspension gebracht.
- (6) Der Unterdruck wird auf -0,75 bis -0,8 bar erhöht und für 5-10 min konstant gehalten; an der Wand des Glasröhrchens entsteht ein dünner Film. Bei diesem Schritt sollte möglichst nicht gevortext werden.
- (7) Zuletzt werden in das Glasgefäß 165 μ l Liposomenpuffer gegeben und die entstehenden Klümpchen durch starkes Vortexen resuspendiert. Zur Entfernung der Lösungsmittelreste wird der Unterdruck auf -0,9 bar gesteigert, nach ca. 10 min ist die Liposomenpräparation beendet.
- (8) Die Abtrennung der Liposomen von nicht eingebauter Nukleinsäure erfolgt durch Zentrifugation in einem Ficoll-Dichtegradienten.

4.2 Konzentrierung von Nukleinsäuren

Durch Fällung mit Alkohol können Nukleinsäuren konzentriert, in andere Puffer überführt und von alkohollöslichen Verunreinigungen abgetrennt werden. Mit Ethanol wird DNA und RNA von zehn Nukleotiden aufwärts bei tiefen Temperaturen präzipitiert. DNA ab 70 Basenpaaren kann bei RT mit kleinen Volumina Isopropanol gefällt werden.

4.2.1 Fällung mit Ethanol

- (1) Zu Nukleinsäurelösungen wird 1/9 bis 1/10 ihres Volumens 3 M Na-Acetatlösung pH 5 gegeben und gemischt, dann werden 2-3 Volumina Ethanol dazugegeben, erneut gemischt und stark abgekühlt.
- (2) Die Abkühlung und Fällung findet je nach Volumen 15-30 min bei -80°C oder 2-4 h bei -20°C statt.
- (3) Das Präzipitat wird durch hochtourige Zentrifugation pelletiert.

<u>Volumen</u>	<u>Zentrifuge</u>	<u>Bedingungen</u>
bis 2 ml	Sigma 2 MK	30 min; 5°C ; 12-14.000 Upm
bis 50 ml	Christ Minifuge II	30 min; 5°C 5.500 Upm
bis 250 ml	Beckman JA 14	30 min; 5°C 8.000 Upm

- (4) Der Überstand wird abgekippt und das Pellet mit 70% Ethanol durch starkes Vortexen "gewaschen".
- (5) Es wird erneut zentrifugiert (10-15 min) und der Überstand entfernt. Das Sediment wird im Vakuum getrocknet und kann bei -20°C gelagert oder in Puffer aufgenommen werden.

4.2.2 Fällung mit Isopropanol

- (1) Die DNA-Lösung wird durch Zugabe von 1/9 Volumen einer 5 M NaClO₄ auf 0,5 M Na⁺ gebracht und gemischt; dazu gibt man 1 Volumen Isopropanol, mischt und inkubiert 5-30 min bei RT.
- (2) Die Zentrifugation und das Waschen des Pellets erfolgt wie für die Ethanolfällung angegeben, durch Waschen mit 70% Ethanol wird das Trocknen des Sediments erleichtert.

4.3 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Radioaktiv markierte Nukleinsäuren können als Längenmarker, Hybridisier-sonden oder Primer für cDNA-Synthesen verwendet werden. Die Markierung erfolgt durch Jodmarkierung mit [¹²⁵I] (41), durch Ansetzen eines [³²P]-Phosphats am 5'Ende (42) oder durch Einbau von [³²P]-markierten Ribonukleotiden in *in vitro* synthetisierte RNA-Transkripte (43).

4.3.1 Markierung von PSTVd-RNA mit ¹²⁵I

Das markierte Iodatom wird kovalent in den Cytosinring in der Position 5 eingebaut, auf diese Weise kann aufgereinigte, native, zirkuläre PSTVd-RNA radioaktiv markiert werden.

Puffer:

Na-Acetat, pH 4,5	200 mM
Na-Phosphat, pH 6,8	400 mM

Mix A:

TlCl ₃	1,553 mg	(5 mM)
Na-Acetat, pH 4,5	1 ml	(200 mM)

Mix B:

Na ₂ SO ₃	6,3 mg	(50 mM)
Na-Acetat, pH 4,5	1 ml	(200 mM)

Durchführung

- (1) 1 µg PSTVd-RNA wird als trockenes Pellet in einem Eppendorfcap in 13,25 µl H₂O gelöst.

Ansatz:

PSTVd/H ₂ O	13,25 µl
Mix A	3,75 µl
Na-Acetat	3,0 µl
Na[¹²⁵ I] (1 mCi)	10,0 µl

Der Reaktionsansatz wird 20 min bei 70°C inkubiert, anschließend im Eisbad abgekühlt.

- (2) 5 µl Puffer B und 150 µl Na-Phosphatpuffer werden dazugegeben und weitere 30 min bei 60°C inkubiert.
- (3) Die Lösung wird im Eisbad gekühlt. Die Abtrennung von nicht umgesetzten ¹²⁵I⁻ erfolgt durch Gelfiltration über eine Biogelsäule mit sterilem TE-Puffer.
- (4) 5 µl der Fraktionen werden mit 1 ml Szintillationslösung (Roth, Rotiszint 22) gemessen, die Fraktionen mit der markierten PSTVd-RNA werden vereinigt und eingefroren.

4.3.2 Markierung von DNA-Fragmenten mit T4-Polynukleotidkinase

Das 5'OH-Ende von DNA-Fragmenten oder von synthetischen DNA-Oligonukleotiden wird durch Übertragung des gamma-Phosphats von ATP radioaktiv markiert. Für 1-10 pMol 5'Enden werden 10-150 µCi gamma-[³²P]-ATP und 5-10 Einheiten Enzym eingesetzt.

Kinasepuffer:

Tris/HCl, pH 7,6	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	5 mM
Spermidin	0,1 mM
EDTA	0,1 mM

Durchführung

- (1) Die Kinasereaktion erfolgt 30 min bei 37°C.

- (2) Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration von 20 mM) oder durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt. Die Nukleotide werden durch Ethanolfällung oder durch Chromatographie über Biogelsäulchen abgetrennt.

4.3.3 Markierung von SP6-RNA durch "analytische" SP6-Transkription

Mit SP6-Polymerase kann von entsprechenden DNA-Matrizen *in vitro*-RNA hergestellt werden, die (+)- oder (-)PSTVd-Polarität besitzt. Durch Zugabe von alpha-[³²P]-markiertem UTP erhält man Transkripte mit hoher spezifischer Aktivität, die für strangspezifische PSTVd-Hybridisierung eingesetzt werden können.

Ansatz:

Tris/HCl, pH 7,5	40 mM
MgCl ₂	6 mM
DTT	10 mM
Spermidin	4 mM
ATP, GTP, CTP	je 0,5 mM
UTP	0,01 mM
RNasin	100 U/ml
BSA, Gibco/BRL	0,1 ug/ml
DNA-Matrize	5 ug/ml
alpha-[³² P]-UTP	100 uCi

Die Reaktion wird in 20 µl mit 10 Einheiten SP6-Polymerase (Renner) durchgeführt. Nach 3 h wird die DNA-Matrize durch 6 Einheiten RNase-freie DNase (Boehringer) abgebaut, der Reaktionsmix durch Phenol extrahiert und die wässrige Phase über ein Biogelsäulchen aufgetrennt. Nach der Abtrennung der freien Nukleotide wird die eingebaute Radioaktivität in den Fraktionen bestimmt, die Transkripte werden vereint.

4.4 Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren werden aus Zellhomogenaten und enzymatischen Reaktionen durch Phenol von Proteinen abgetrennt. Die wässrige Phase wird mit Chloroform/Isoamylalkohol nachgereinigt, die Nukleinsäuren werden durch Ethanol-fällung daraus zurückgewonnen und aufkonzentriert.

Extraktionspuffer TES:

Tris	12,1 g	(100 mM)
EDTA	3,7 g	(10 mM)
NaCl	5,84 g	(100 mM)
Aqua bidest.	ad 1 l	

Der pH-Wert 7,5 wird mit Salzsäure eingestellt, der Puffer wird autoklaviert und bei RT gelagert.

SDS-Lösung:

10 g Natrium-Dodecylsulfat werden in 100 ml H₂O bidest. gelöst und bei RT gelagert.

Tris/EDTA-Puffer (TE 1x):

Tris	1,21 g	(10 mM)
EDTA	0,37 g	(1 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Der pH wird auf den gewünschten Wert zwischen 7 und 8 mit HCl eingestellt und der Puffer autoklaviert. Es kann auch eine 10-20fach konzentrierte Stammlösung hergestellt werden, die bei Bedarf mit autoklaviertem H₂O bidest. verdünnt werden kann.

Natriumacetat-Puffer (3 M):

Na-Acetat	246,1 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Der pH wird mit Essigsäure auf 5 eingestellt und die Lösung 20 min autoklaviert.

Puffergesättigtes Phenol:

Phenol p.A.	1 kg
8-Hydroxychinolin	1 g
TES Puffer	300 ml

Die Phenollösung wird über Nacht bei RT gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.

Schüttelphenol:

Phenol p.A.	1 kg
Chloroform	250 ml
Isoamylalkohol	40 ml

Das Phenol wird bei RT gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt. Einige Stunden vor Gebrauch wird der benötigte Teil mit TES-Puffer äquilibriert und zur Phasentrennung stehen gelassen.

Extraktionsphenol:

Phenol p. A.	1 kg
8-Hydroxychinolin	1 g
Chloroform	250 ml

Das Extraktionsphenol wird ÜN bei RT gelöst. Dann wird es solange mit 1 M Tris pH 8 ausgeschüttelt und die wässrige Phase ausgetauscht, bis ein stabiler pH-Wert 8 in der wässrigen Phase erreicht ist. Die wässrige Phase wird abschließend durch TE-Puffer ersetzt und das Extraktionsphenol in Aliquots von ca. 500 µl in Eppendorfgefäßen bei -20°C aufbewahrt.

Chloroform/Isoamylalkohol:

240 ml Chloroform und 10 ml Isoamylalkohol werden gemischt und bei RT gelagert.

4.4.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus enzymatischen Reaktionen

- (1) 100-200 µl aufgetautes Extraktionsphenol werden zum Reaktionsansatz pipettiert und 10-15 sek durch Vortexen gemischt; das im Phenol gelöste Chloroform erleichtert die Phasentrennung.

- (2) Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation in einer Eppendorftischzentrifuge (15-30 sek). Der wässrige Überstand kann durch Chloroform/Isoamylalkohol weiter aufgereinigt werden.

4.4.2 Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellkulturen

Die Nukleinsäureextraktion aus Zellkulturen erfolgt meistens aus Suspensionszellen, kann aber in gleicher Weise bei Kalluskulturen durchgeführt werden.

Aus Protoplasten werden die Nukleinsäuren durch starkes Schütteln mit Phenol und TES/SDS-Puffer gelöst. Bei 2 Tage alten Protoplasten müssen die frischgebildeten Zellwände wieder durch "Mörsern" mit Seesand aufgebrochen werden.

Durchführung:

- (1) Die Suspensionszellen werden in den Schüttelkolben im Eisbad abgekühlt und in 50 ml-Falconröhrchen sedimentiert (Christ Minifuge, 10 min; 2.000 Upm; 5°C). Das gepackte Zellvolumen wird bestimmt, das überstehende Kulturmedium wird abgegossen, das Pellet in gekühltem TES-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min; 2.000 Upm; 5°C).
- (2) In eine große Reibeschale wird flüssiger Stickstoff gefüllt, den man bis auf einen kleinen Rest verdampfen läßt. Die sedimentierten, in TES-Puffer gewaschenen Suspensionszellen werden erneut pro gepacktes Zellvolumen in 1 Volumen TES-Puffer resuspendiert und in die Reibeschale gegossen. Seesand (geglüht, Merck Nr. 7712) wird zugegeben und mit dem Pistill gemörsert. Bevor die Zellen auftauen, wird unter stetigem Reiben schrittweise puffergesättigtes Phenol zugegeben; durch weitere Zugabe von Seesand oder Phenollösung wird eine breiförmige Konsistenz erreicht. Von der 10% SDS-Lösung wird 1/10 Volumen des gepackten Zellvolumens hinzupipettiert und ca. 5 min kräftig weitergemörsert.
- (3) Durch Zugabe von Phenollösung in insgesamt 2-3facher Menge des gepackten Zellvolumens entsteht eine milchig-gelbe Suspension. Der In-

halt der Reibeschale wird in 50 ml-Falconröhrchen weitere 10-15 min bei RT stark geschüttelt.

- (4) Wässrige Phase und Phenolphase werden durch Zentrifugation (20 min; 5.500 Upm; 5°C) getrennt, die wässrige Phase wird abpipettiert und in gleichem Volumen Schüttelphenol weiter extrahiert. Zur Phenolphase werden 5-10 ml TES-Puffer gegeben, durch 5-minütiges Schütteln nachextrahiert und erneut zentrifugiert (20 min; 5.500 Upm; 5°C). Die wässrige Phase wird abgenommen und zur bereits entnommenen wässrigen Phase gegeben.
- (5) Der vereinigte Überstand wird weitere 15 min bei RT mit Schüttelphenol extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wird der wässrige Überstand mit Chloroform/Isoamylalkohol nachgereinigt.
- (6) Zur gewonnenen wässrigen Lösung werden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung und Ethanol (techn.) bis zu einer Endkonzentration von 10-15% gegeben, kurz gemischt und mindestens 2 h bei 0°C im Eisbad inkubiert. Die ausgefallenen Polysaccharide werden pelletiert (40 min; 5.500 Upm; 5°C). Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das Volumen bestimmt. Das gallertartige Pellet wird verworfen.
- (7) Aus dem Überstand werden die Nukleinsäuren gefällt, dafür werden 2,5 bis 3 Volumina Ethanol zugegeben. Die Mischung wird bei -20°C mindestens 2 h inkubiert.
- (8) Die gefällten Nukleinsäuren werden in einer Christ Minifuge (40 min; 5.500 Upm; 5°C) oder bei großen Volumina in einer Beckman Kühlzentrifuge pelletiert (40 min; 8.000), das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.
Die gewonnene Gesamtnukleinsäure kann durch Fraktionierung weiter aufgereinigt werden.

4.4.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus Mikrokalli und anschließende Dot-Blot-Analyse

- (1) Die Mikrokalli werden in die Mulde einer Tüpfelplatte gelegt; dazu pipettiert man 100 µl Schüttelphenol, 50 µl TES-Puffer und 5 µl SDS-Lösung. Mit einem kleinen Pistill werden die Zellen gemörsert, die

Extraktionslösung wird in einem Eppendorfgemäß gesammelt, Pistill und Mulde werden mit 150 µl TES und 200 µl Schüttelphenol nachgespült.

- (2) Der Ansatz wird kurz gemischt (Vortex), zentrifugiert (Sigma: 5 min; 14.000 Upm; 5°C) und der Überstand mit Chloroform/Isoamylalkohol nachgereinigt.
- (3) Der Überstand wird mit 200 µl Formaldehyd/0,5 M Na-Phosphat-Puffer (1/1) 20 min bei 60°C denaturiert.
- (4) Die denaturierte Probe wird mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur aufgetragen. Der Viroidnachweis erfolgt durch molekulare Hybridisierung (siehe 4.6.3.3).

4.4.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus Tomatenblättern

- (1) Ca. 1 g Blattmaterial (möglichst noch nicht vollständig ausgewachsene Blätter der Sproßspitze und der Blattachseln) werden mit einer Skalpellklinge abgeschnitten, in einem Falcnorröhrchen (50 ml) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Extraktion der Nukleinsäuren bei -80°C aufbewahrt.
- (2) Die gefrorenen Blätter werden in einer Reibeschale mit Seesand (geglüht; Merck) und einem Pistill vorsichtig pulverisiert. Das Probenmaterial darf nicht auftauen!
- (3) 10 ml puffergelöstes Phenol wird schrittweise in die Reibeschale pipettiert und das pulverisierte Blattmaterial mit dem Pistill weiter gemörst (evtl. unter weiterer Zugabe von Seesand). Unter ständigem Reiben werden 6 ml TES-Puffer und 0,6 ml SDS-Lösung (10%) hinzupipettiert. Der Inhalt des Reibeschälchens wird in das Falcnorröhrchen (50 ml) zurückgegossen, Reibeschale und Pistill werden mit 2 ml TES-Puffer nachgespült.
- (4) Das verschlossene Zentrifugenröhrchen wird kräftig von Hand, mit einem Vortexmischgerät oder 10-15 min auf einem Schütteltisch bei 200-300 Upm geschüttelt.
- (5) Die Trennung von Phenol- und wässriger Phase erfolgt durch Zentrifugation in der Christ Minifuge (20-30 min; 5.500 Upm; 5°C).

- (6) Der leicht trübe, wässrige, nukleinsäurehaltige Überstand wird vorsichtig abgesaugt, mit 15 ml Schüttelphenol versetzt und weiter geschüttelt. Die Phenolphase wird mit 2 ml TES-Puffer nachextrahiert, die wässrigen Überstände werden im Schüttelphenol vereinigt und durch Vortexen und Zentrifugieren erneut extrahiert.
- (7) Die abschließende Extraktion der wässrigen Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol beseitigt die phenolischen Reste aus dem wässrigen Überstand. Es genügt eine Zentrifugation von 10 min bei 5.500 Upm und 5°C.
- (8) Der aufgereinigte Nukleinsäureextrakt wird durch Ethanol-fällung konzentriert und in einem 50 ml-Falconröhrchen sedimentiert, das Sediment unter Vakuum im Lyophilisator getrocknet.

4.5 Auftrennung von Nukleinsäuren

4.5.1 "Vorfraktionierung" mit Lithiumchlorid

Viroid-RNA ist wie andere kleine RNA und DNA in hohen Salzkonzentrationen löslich. Die ribosomale RNA ist unlöslich und kann durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Abtrennung der LiCl-löslichen Nukleinsäuren erfolgt in Form einer Extraktion aus dem getrockneten Pellet, ein großer Teil der schwer löslichen höhermolekularen DNA bleibt ebenfalls im Pellet zurück.

2 M LiCl-Lösung:

8,48 g Lithiumchlorid werden in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst, durch ein 0,22 µm-Sterilfilter filtriert und anschließend 20 min bei 121°C autoklaviert. Die sterile Lösung kann bei RT gelagert werden.

Durchführung:

- (1) Je nach Größe des Pellets werden 1 bis 5 ml 2 M LiCl-Lösung in das Zentrifugenröhrchen gegeben und 2 h im Kühllabor kräftig geschüttelt. Die Lösung wird durch Zentrifugation geklärt (20 min; 5.500 Upm; 5°C).

- (2) Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die pelletierte rRNA wird mit 0,5-1 ml 2 M LiCl nachextrahiert (30 min Schütteln; Kühllabor) und abschließend zentrifugiert.
- (3) Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat Lösung und 2,5 Volumen Ethanol wird die "s-RNA" bei -20°C gefällt. Nach Abzentrifugieren, Waschen und Trocknen kann das Nukleinsäurepellet nochmals mit LiCl nachgereinigt werden.

4.5.2 Abtrennung von niedermolekularen Bestandteilen durch Gelfiltration

Nukleotide, Na¹²⁵I und andere niedermolekulare Bestandteile von Reaktionen können von hochmolekularen Molekülen durch Gelfiltration über ein Biogel-Minisäulchen abgetrennt werden.

Durchführung

- (1) Eine Pasteurpipette (hitzeesterilisiert) wird in der Verengung mit silanisierter, autoklavierter Watte verstopft und mit Biogel A 0,5 (BioRad) bis knapp unter den Rand gefüllt. Die Säule wird mit sterilem TE-Puffer äquilibriert.
- (2) Das Reaktionsgemisch wird auf das Minisäulchen aufgetragen, als Vorlauf werden 500 ul Puffer schrittweise zugegeben.
- (3) Die Fraktionen werden in sterilen Eppendorfhütchen gesammelt, die Auftrennung erfolgt in 100 ul-Schritten. Nach Einsickern des Vorlaufs wird das Säulchen in das zweite Eppendorfhütchen umgesetzt. 100 ul TE-Puffer werden aufgetragen, nach Einsickern des Puffers in die Matrix wird das Säulchen in das nächste Hütchen umgesetzt.
- (4) Nach ca. 700 ul ist die gesamte hochmolekulare Nukleinsäure eluiert. Die Fraktionierung wird noch zwei bis drei Schritte fortgesetzt.
- (5) Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wird bestimmt, die Fraktionen werden dem Elutionsprofil entsprechend vereinigt. Die abgetrennte Nukleinsäure kann durch Ethanolfällung oder Verdünnung mit Puffer auf die gewünschte Konzentration gebracht werden.
- (6) Für die Abtrennung der "kalten", präparativen SP6-Transkripte werden 700 ul (einschließlich Probenvolumen) Vorlauf verwendet, die Nukle-

insäuren werden durch 650 µl Puffer in ein einziges Eppendorfgefäß eluiert. Die Konzentration der Nukleinsäure kann daraus photometrisch bestimmt werden.

4.5.3 Auftrennung im Saccharosedichtegradienten

Bei der Auftrennung von Makromolekülen in einer Mischung durch Zentrifugation macht man sich die unterschiedliche Dichte bzw. Sedimentationsgeschwindigkeit der Komponenten zunutze. Die meisten biologischen Moleküle besitzen eine sehr hohe Dichte. Für die Gleichgewichtszonenzentrifugation (isopycnic centrifugation) werden deshalb Lösungen mit hohem Atomgewicht und hoher Löslichkeit benötigt. Die Salze CsCl und Cs₂SO₄ und die iodinierten organischen Verbindungen Metrizamid und Nycodenz erfüllen diese beide Anforderungen (44,45). Eine Auftrennung nach Sedimentationsgeschwindigkeit wird in der Zonenzentrifugation (rate-zonal centrifugation) erreicht. Die Partikel wandern in Zonen in Richtung der Erdbeschleunigung durch den Gradienten und sedimentieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zentrifugationsdauer, Dichtegradient und Zentrifugalbeschleunigung müssen für die aufzureinigenden Proben experimentell bestimmt werden. In den meisten Fällen wird Saccharose als Dichtegradientenmedium verwendet.

Materialien

Lithium Dodecylsulfat, LDS (Sigma, L-4632)

Diethylpyrocarbonat, DEP (Sigma, D-5758)

Saccharose-Stammlösung 80% (W/V):

80 g Saccharose (für Dichtegradientenzentrifugation, Merck, 7654) werden in H₂O bidest. über Nacht gelöst, das Volumen wird auf 100 ml gebracht, die Stammlösung im Kühlschrank aufbewahrt.

Gradientenlösungen:

- Gradientenpuffer

Tris/HCl pH 7,5	20 mM
EDTA	10 mM
DTT	1 mM
LDS	1%

- 40% Saccharose

Saccharose (80%)	59,1 ml	(40% W/W)
Tris/HCl (1 M)	2 ml	(20 mM)
EDTA (0,1 M)	10 ml	(10 mM)
DTT (1 M)	0,1 ml	(1 mM)
LDS	1 g	(1%)
Aqua bidest., steril	ad 100 ml	

- 5% Saccharose

Saccharose (80%)	6,4 ml	(5% W/W)
Tris/HCl (1 M)	2 ml	(20 mM)
EDTA (0,1 M)	10 ml	(10 mM)
DTT (1 M)	0,1 ml	(1 mM)
LDS	1 g	(1%)
Aqua bidest., steril	ad 100 ml	

Zu den Saccharose-Lösungen werden jeweils 100 µl DEP gegeben und kurz geschüttelt. Nach einigen Minuten Inkubation bei RT werden die Lösungen auf 60-80°C erwärmt und 20-30 min stark gerührt. Sie können auch für 20 min bei 80°C und leichtem Unterdruck in einen heizbaren Vakuumschrank (zum "Backen" der Nitrocellulose) gestellt werden. Das DEP zerfällt zu Ethanol und CO₂ und verdunstet. Die Lösung wird anschließend auf 5°C abgekühlt.

Zentrifugenrotor SW 41Ti; autoklavierte Zentrifugenröhrchen.

Durchführung

- (1) Die Herstellung und die abschließende Fraktionierung des Gradienten findet im Kühllabor bei 5-10°C statt. Die Kammern des Gradientenmischers und die ableitenden Schläuche werden mit einer 0,1% DEP-Lö-

- sung gespült, die gesamte Apparatur wird mit H₂O bidest. nachgespült.
- (2) Die Verbindung zwischen den Lösungskammern des Gradientenmischers und der Auslauf der Mischkammer werden geschlossen, in die Mischkammer (vorne) werden 5,5 ml der 5% Saccharose-Lösung pipettiert. Nachdem durch kurzes Öffnen des Verbindungshahns die Luft aus dem Verbindungsstück abgelassen wurde, werden in die hintere Kammer 5,5 ml 40% Saccharose pipettiert.
 - (3) Am anderen Ende des Silikonschlauches ist eine Glaskapillare durch eine Laborklemme so befestigt, daß sie senkrecht nach unten zeigt. Von unten wird das in einen Ständer gestellte Zentrifugenröhrchen durch einen "Laborboy" nach oben gedreht, bis die Glaskapillare innen den Boden fast berührt.
 - (4) Der Rührer in der ersten Mischkammer wird gestartet, der Verbindungshahn und der Auslauf geöffnet, die Gradientenherstellung beginnt. Die nachströmende, dichter werdende Gradientenlösung verdrängt die davor laufende Saccharoselösung im Zentrifugenröhrchen langsam nach oben.
 - (5) Wenn beide Kammern leer sind, wird der Silikonschlauch abgeklemmt, das Zentrifugenröhrchen langsam abgesenkt und bis zur Beladung mit Probe bei 5°C gelagert.
 - (6) Die Mischapparatur kann, nachdem sie mit sterilem Aqua bidest. gespült wurde, für die Herstellung eines weiteren Gradienten benützt werden.
 - (7) Die Nukleinsäure wird in 500 µl Gradientenpuffer gelöst. Die Proben werden 10 min bei 65°C inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden. Die im Eisbad abgekühlte Probe wird vorsichtig auf den Gradienten geschichtet. Dazu wird die Spitze der Pipette so an den Rand des Zentrifugenröhrchens gesetzt, daß sie die Oberfläche des Gradienten berührt und die Lösung vorsichtig aufgelagert werden kann.
 - (8) Die Zentrifugenröhrchen werden durch Zugabe von Gradientenpuffer gegeneinander austariert und verschlossen. Die Zentrifugation erfolgt über Nacht (14 h; 41.000 Upm; 5°C).

- (9) Die Gradienten werden mit einer Glaskapillare von unten durch Absaugen "geerntet": Man führt die Glaskapillare zum Boden des Gradientenröhrchens und saugt die Saccharoselösung durch eine Schlauchpumpe ab. Die Fraktionen werden mit einem LKB-Fraktionssammler (LKB, 8032 Gräfelding) in 2,2 ml-Eppendorfgefäßen aufgefangen. Mit 40 Tropfen pro Fraktion wird der Gradient in 16-20 Fraktionen aufgeteilt.
- (10) Die Nukleinsäuren in den einzelnen Fraktionen werden durch Ethanol-fällung zurückgewonnen und können weiter analysiert werden.

4.5.4 Auftrennung durch Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können anhand ihrer Wanderungseigenschaften in einer Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Es können dafür unterschiedliche Materialien verwendet werden; für die Auftrennung großer DNA-Fragmente (länger als 1.000 Nukleotide) wird Agarose, für die Auftrennung kurzer DNA-Fragmente und von RNA wird 5% Polyacrylamid benutzt. Durch 8 M Harnstoff und erhöhte Temperatur werden die Nukleinsäuren im Gelsystem zu Einzelsträngen denaturiert; dies kann auch durch eine chemische Modifikation mit Formaldehyd oder Glyoxal erreicht werden.

4.5.4.1 Gelelektrophorese in Agarose

Elektrodenpuffer Stammlösung (20x TAE):

Tris	96,9 g	(800 mM)
Na-Acetat	8,2 g	(100 mM)
EDTA	7,4 g	(20 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Probenpuffer:

Tris/Essigsäure pH 7,8	10 mM
EDTA	1 mM
Ficoll 400	10%
SDS	0,1%
Bromphenolblau	0,1%

Durchführung

- (1) Die Agarose (BRL, 5510 UB) wird in der benötigten Konzentration (0,8-1,5%) in 1x TAE-Elektrophoresepuffer durch Kochen gelöst. Die abgekühlte Agaroselösung (ca. 60°C) wird in die vorbereitete Form gegossen, der Probenkamm eingesteckt.
- (2) Die DNA-Proben werden mit 10 µl Probenpuffer gemischt und nach Verfestigung der Agarose in die Probetaschen pipettiert. Die Flachbettelektrophorese wird mit 4 V/cm durchgeführt.

4.5.4.2 Gelelektrophorese in Polyacrylamid

Polyacrylamidlösung 1 (für Trenngele):

Acrylamid	30 g	(30%)
Bis-acrylamid	0,75 g	(0,75%)
Aqua bidest., steril	ad 100 ml	

Polyacrylamidlösung 2 (für Sammelgel):

Acrylamid	10 g	(10%)
Bis-acrylamid	2,5 g	(2,5%)
Aqua bidest., steril	ad 100 ml	

APS-Lösung (10%):

1 g Ammoniumperoxodisulfat wird in 10 ml H₂O bidest. gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt.

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, reinst (Serva, 35925)

TBE-Puffer (1 M) pH 8,3:

Tris	121,1 g	(1 M)
Borsäure	51,1 g	(830 mM)
EDTA	3,7 g	(10 mM)
Aqua bidest.	ad 1 l	

Es stellt sich ein pH von 8,3 ein.

Probenpuffer "nativ":

TBE	22,5 mM
EDTA	1 mM
Ficoll 400	10%
SDS	0,1%
Bromphenolblau	0,1%
Xylencyanol	0,1%

Probenpuffer "denaturierend":

EDTA	1 mM
Formamid	95%
Bromphenolblau	0,1%
Xylencyanol	0,1%

Probenpuffer für Phosphatgele:

Na-P-Puffer (0,5 M, siehe unten)	10 mM
EDTA	1 mM
Ficoll 400	10%
SDS	0,1%
Bromphenolblau	0,1%
Xylencyanol	0,1%

Natrium-Phosphatpuffer (0,5 M) pH 6,5:

A:	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$	69 g
	Aqua bidest.	ad 1 l
B:	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{x2H}_2\text{O}$	89 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

Es wird zu Lösung A soviel von Lösung B gegeben, bis ein pH von 6,5 erreicht ist (ca. 880 ml Lsg. B).

Die Pufferstammlösungen werden 20 min bei 121°C autoklaviert und bei RT gelagert.

5% Polyacrylamid/TBE-Gel "nativ"

- (1) Ansatz für ein Gel (20x25x0,15 cm):

PAA-Lösung 1	10 ml	(5%)
TBE-Lsg. (1M)	1,35 ml	(22,5 mM)
APS-Lsg. (10%)	256 μ l	
Aqua bidest., steril	ad 60 ml	

Die Gellösung wird gemischt, durch Zugabe von 44 μ l TEMED die Polymerisation gestartet, zwischen die Glasplatten gegossen und der Probenkamm eingesteckt.

Elektrodenpuffer: TBE 22,5 mM.

- (2) Es werden 20 V/cm angelegt (bzw. 12 W limitierend) und die Elektrophorese beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau durch das Gel gelaufen ist.

5% Polyacrylamid/TBE-Gel "denaturierend":

Ansatz:

PAA-Lsg. 1	10 ml	(5%)
TBE-Lsg. (1 M)	1,35 ml	(22,5 mM)
Harnstoff	28,8 ml	(8 M)
Aqua bidest., steril	ca. 18 ml	

- (1) Die Mischung wird erwärmt, bis der gesamte Harnstoff gelöst ist, dann werden 256 μ l APS-Lösung zugegeben und mit sterilem H₂O bidest. auf 60 ml aufgefüllt. Nach dem Mischen wird die leicht abgekühlte Lösung über ein Faltenfilter gereinigt, mit 44 μ l TEMED-Lösung die Polymerisation gestartet und die Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen.
- (2) Die Proben werden in 20 μ l Probenpuffer aufgenommen und 90 sek im kochenden Wasserbad denaturiert, anschließend im Eisbad abgeschreckt und in die Probentaschen aufgetragen.
- Elektrodenpuffer: 22,5 mM TBE.
- (3) Der Gellauf erfolgt bei 20 V/cm und wird beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau durch das Gel gelaufen ist.

5% PAA/Natrium-Phosphat pH 6,5

Bei der elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren, die auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden sollen, wird Na-Phosphat (Na-P) als Elektrodenpuffer verwendet. Ein Pufferwechsel im Gel für den Elektrotransfer der Nukleinsäuren auf die Nitrocellulosemembran ist nicht mehr notwendig. Die Nukleinsäuren werden durch Glyoxal denaturiert: Glyoxal bindet kovalent an Guanosin und verhindert Wasserstoffbrücken mit Cytosin (46). Es kann durch "Backen" der Nitrocellulosemembran bei 80°C wieder entfernt werden.

(1) Trenngel:

PAA-Lsg. 1	10 ml	(5%)
Na-P-Puffer (0,5 M)	2,4 ml	(20 mM)
APS-Lsg. (10%)	256 µl	(0,04%)
Aqua bidest., steril	ad 60 ml	

Die Polymerisation wird durch Zugabe von 44 µl TEMED gestartet, ca. 50 ml der Lösung werden zwischen die Glasplatten gegossen und 2 ml H₂O bidest. vorsichtig aufgelagert. Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen und das Sammelgel aufpolymerisiert.

(2) Sammelgel:

PAA-Lsg. 2	3 ml	(2,5%)
Na-P-Puffer (0,5 M)	120 µl	(5 mM)
APS-Lsg. (10%)	53 µl	(0,04%)
Aqua bidest. steril	ad 12 ml	

Zum Starten der Polymerisation werden 9 µl TEMED zugegeben, die Lösung wird gemischt und auf das Gel aufgegossen. Das Sammelgel wird milchig trüb.

(3) Die Proben werden in 8 µl sterilem Aqua bidest. gelöst.

DMSO-Mix (22 µl):

DMSO	15 µl	(25 Teile)
Na-P-Puffer (0,5 M)	0,6 µl	(1 Teil)
SDS-Lsg. (10%)	0,6 µl	(1 Teil)
Glyoxal-Lsg. (30%)	5,8 µl	(9,7 Teile)

Pro Probe werden 22 µl DMSO-Mix zugegeben, kurz gemischt, 15 min bei 50°C inkubiert und im Eisbad abgekühlt. Zu den denaturierten Proben werden 10 µl Probenpuffer pipettiert, gemischt und die 40 µl aufgetragen.

Elektrodenpuffer: 20 mM Na-Phosphat.

- (4) Der Gellauf erfolgt bei RT. Für das Sammelgel werden 6 V/cm und für das Trenngel 12 V/cm Spannung angelegt. Der Lauf wird beendet, wenn das Bromphenolblau durch das Gel gelaufen ist.

4.5.5 Auftrennung von DNA im Sequenzgel

Radioaktiv markierte DNA-Fragmente, die während der Sequenzierung nach Maxam Gilbert oder Sanger und Coulsen entstehen, werden unter denaturierenden Bedingungen im Sequenzgel aufgetrennt. Längenunterschiede von einer Base werden durch das hohe Auflösungsvermögen sichtbar (47). Für die Auftrennung werden ausschließlich Gradientengele mit einer Länge von 60 cm und einer Breite von 20 cm benutzt, die sich nach unten keilförmig verdicken. Der Gradient wird logarithmisch gewählt, die Wanderungsgeschwindigkeit der kleinen Fragmente, die einen großen Teil des Gels durchlaufen haben, wird im unteren Bereich entsprechend der Länge linear verlangsamt. Durch diese Stauchung können längere Sequenzbereiche "gelesen" werden. Die beiden Glasplatten sind so mit unterschiedlichen Silikonverbindungen beschichtet, daß das Polyacrylamid mit der Oberfläche der einen Glasplatte kovalent verknüpft wird, während die andere Platte sich leicht ablösen läßt. Das Sequenzgel verbleibt nach der Elektrophorese auf der Glasplatte und wird nach dem Trocknen direkt "autoradiographiert".

Materialien:

Dichlordimethylsilan 5% (v/v) in Tetrachlorkohlenstoff gelöst (für leichtes Abnehmen der "Öhrchenplatte") von Merck-Schuchardt.

Gamma-Methacryloxypropyltrimethylsilan GF 31 (Wacker, München)

pro Glasplatte:

Ethanol p.A.	1 ml
Essigsäure (10%)	30 µl
Silanlösung GF 31	3 µl

Acrylamid (BioRad, 161-0101)

Bisacrylamid (BioRad, 161-0800)

Harnstoff (Sigma, U-5378)

Polyacrylamidlösung S:

Acrylamid	40 g	(40%)
Bisacrylamid	2 g	(2%)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Probenpuffer:

EDTA	1 mM
Formamid	95%
Bromphenolblau	0,1%
Xylencyanol	0,1%

Durchführung

- (1) Die "Öhrchenplatte" wird mit 3 ml der 5% Dichlormethylsilanlösung silanisiert. Nach dem Trocknen wird die Oberfläche mit Ethanol abgerieben und leicht poliert.
- (2) Die "Nicht-Öhrchenplatte" wird mit der frisch hergestellten Methacryloxypropyltrimethylsilan-Lösung beschichtet. Nach dem Trocknen wird auch sie mit Ethanol abgerieben und poliert. Diese Silanverbindung reagiert sowohl mit den Siliciumoxid der Glasoberfläche als auch mit dem Acrylamid.

(3) Gellösung:

PAA-Lösung S	10 ml	(5%)
TBE (1 M)	8 ml	(100 mM)
Harnstoff (BioRad)	33,6 g	(8 M)
Aqua bidest.	40 ml	

Der Harnstoff wird durch Erwärmen gelöst; es muß hochaufgereinigter Harnstoff verwendet werden, um ein "Verschmieren" der Banden durch Salzeffekte zu vermeiden.

Zur Lösung werden 800 µl APS-Lösung (10%) pipettiert, sie wird mit H₂O bidest. auf 80 ml aufgefüllt und über ein Faltenfilter filtriert. Die Polymerisation wird durch 35 µl TEMED gestartet.

- (4) Die Teflonspacer werden auf der "Nichtöhrchenplatte" fixiert. Die Glasplatte wird auf die Gelschiebeapparatur, einen horizontalen Tisch mit seitlichen Führungshilfen, gelegt. Ein Teil der Polyacrylamidlösung wird auf den unteren Teil der Glasplatte gegossen und die "Öhrchenplatte" vorsichtig mit ihrem oberen Ende auf die Lösung aufgelegt. Die Acrylamidlösung verteilt sich zwischen den Platten. Die aufgelegte Platte wird langsam über die "Nichtöhrchenplatte" nach oben geschoben und weitere Acrylamidlösung nachgegossen. Wenn beide Platten zur Deckung gebracht sind, wird der Probenkamm eingesteckt, die Platten werden aneinandergeklammert. Nach 45-60 min ist die Polymerisation abgeschlossen.

- (5) Der Kamm wird vorsichtig herausgezogen, die Glasplatten werden in eine vertikale Gellaufapparatur eingespannt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült. Zur gleichmäßigen Wärmeleitung wird eine 3-4 mm dicke Aluminiumplatte vor die Glasplatten geklemmt.
- (6) Die Proben werden im Probenpuffer aufgenommen, 90 sek gekocht und im Eisbad abgeschreckt. Jeweils 1 µl wird mit einer ausgezogenen Glaskapillare in die Probetaschen aufgetragen.
- (7) Laufpuffer 100 mM TBE pH 8,3.

Die Elektrophorese erfolgt durch Limitierung der Stromleistung auf 60 W, was einer Spannung von 2500-2800 V entspricht. Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn die gewünschten DNA-Fragmente ins untere Drittel des Gels gewandert sind.

- (8) Die "Öhrchenplatte" wird vorsichtig abgenommen, die Glasplatte mit dem Polyacrylamid 10 min in einer 10% Essigsäurelösung fixiert, der Harnstoff durch 20-minütiges Wässern unter fließendem Wasser aus der Gelmatrix entfernt. Das Gel wird bei 80°C im Trockenschrank getrocknet (ca. 1-2 h).
- (9) Entsprechend der Signalstärke der aufgetrennten DNA-Fragmente wird das Gel durch direktes Auflegen eines Röntgenfilms über Nacht bei RT "autoradiographiert", oder in Haushaltsfolie verpackt und zusammen mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie (Cronex, Quanta III) bei -80°C mehrere Tage exponiert.
- (10) Nach Beendigung der Autoradiographie wird die Gelmatrix in einer 1 M NaOH-Lösung abgelöst. Die Glasplatte wird in einer 10% Essigsäure neutralisiert und mit destilliertem Wasser gespült.

4.6 Nachweis von Nukleinsäuren

Der Nachweis von in Gelsystemen aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgt je nach Konzentration durch Ethidiumbromid, Silberfärbung oder Autoradiographie.

4.6.1 Nachweis mit Ethidiumbromid

- (1) Das Agarose- oder Polyacrylamidgel wird in eine wässrige Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gegeben, nach 15-20 min kurz gewässert und auf einen UV-Monitor gelegt. Das in die Nukleinsäure interkalierte Ethidiumbromid fluoresziert im UV-Licht.
- (2) Für analytische Zwecke wird das Gel mit einem UV-Monitor mit 254 nm durchleuchtet und auf Polaroid-Film Typ 52 oder Typ 55 mit vorge-schaltetem Gelbfilter photographiert.
Für präparative Zwecke wählt man einen UV-Monitor mit langwelligem UV-Licht (366 nm), um Strangbrüche in der gereinigten Nukleinsäure zu vermeiden. Das Gelstück wird ausgeschnitten und die Nukleinsäure durch Isotachophorese oder "Gene-clean" zurückgewonnen.

4.6.2 Nachweis durch Silberfärbung

Der Nachweis von geringen Mengen aufgetrennter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen gelingt durch Silberfärbung. Die oxidative Methode mit Kaliumdichromat wird analog zu Goldman and Merril (48) angewandt. Mit Seidengaze wird das Gel jeweils in frische Photoschalen überführt und leicht geschwenkt. Während des ganzen Prozesses müssen Handschuhe getragen werden, da auch Proteine angefärbt werden.

Durchführung

- (1) Das Gel wird fixiert:

Lösung 1:

Methanol	250 ml	(50%)
Essigsäure	60 ml	(12%)
Aqua bidest.	ad 500 ml	
3-5 min.		

Lösung 2:

Methanol	50 ml	(10%)
Essigsäure	25 ml	(5%)
Aqua bidest.	ad 500 ml	
20 min.		

- (2) Die Oxidation erfolgt mit Kaliumdichromat:

Lösung:

$K_2Cr_2O_7$	0,5 g	(3,4 mM)
HNO_3	98 μ l	(3,2 mM)
Aqua bidest.	ad 500 ml	
5 min.		

- (3) Die Chromatlösung wird aus dem Gel durch Wässern entfernt, das Wasser mehrmals gewechselt, bis die Gelbfärbung aus dem Gel verschwunden ist.

3-5 maliges Wechseln, je 5 min.

- (4) Das Gel wird mit Silbernitrat angefärbt:

Silberlösung:

AgNO ₃	1,02 g	(12 mM)
Aqua bidest.	ad 500 ml	
20 min.		

- (5) Die Entwicklerlösung wird angesetzt und auf drei Photoschalen zu je 500 ml verteilt.

Entwickler:

NaCO ₃ (wasserfrei)	44,5 g	(280 mM)
Formaldehyd	0,75 ml	(ca. 0,02%)
Aqua bidest.	ad 1,5 l	

- (6) Das Gel wird aus der Silberlösung genommen und 1-2 min in Aqua bidest. geschwenkt.
- (7) Das Gel wird ganz kurz in das erste Entwicklerbad getaucht, es entsteht ein wolziger Niederschlag. Das Gel wird sofort herausgenommen, in der zweiten Entwicklerwanne ca. 5 min leicht geschüttelt und in die dritte Wanne gegeben, sobald sich ein bräunlicher Niederschlag zeigt. Die Nukleinsäuren werden als dunkelbraune Banden sichtbar, das Gel verbleibt im dritten Bad, bis sich der Gelhintergrund leicht gelb verfärbt.
- (8) Das Gel wird zuletzt in das Stoppbad überführt, es kann lange Zeit in dieser Lösung im Kühlschrank gelagert werden.

Stopplösung:

Essigsäure	5 ml	(1%)
Aqua bidest.	ad 500 ml	

- (9) Das Gel wird auf einem Leuchttisch unter dem Reprostand auf s/w-Kleinbildfilm zu Dokumentationszwecken fotografiert.

4.6.3 Molekulare Hybridisierung

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren werden durch "Elektroblotting" auf eine feste Matrix (49) übertragen und durch molekulare Hybridisierung mit radioaktiv markierter Nukleinsäure nachgewiesen. Die Überführung von glyoxalierten Nukleinsäuren auf Nitrocellulosemembranen nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung mit Na-Phosphat als Elek-

trodenpuffer führt zu gut reproduzierbaren Resultaten. Die molekulare Hybridisierung nutzt die Fähigkeit der komplementären Einzelstränge von Nukleinsäuren, sich einander anzulagern, die denaturierten Nukleinsäuren auf der Transfermembran "fischen" komplementäre, radioaktiv markierte Einzelstränge (50,51). Je größer diese basengepaarten Bereiche sind, desto höhere Temperaturen werden benötigt, um die Hybride wieder zu trennen. Die Stringenz der Hybridisierung kann durch die Höhe der Temperatur bestimmt werden. Die Nachweisgrenze mit radioaktiv markierter SP6-RNA liegt für PSTVd bei 5 ng (52).

4.6.3.1 Elektrotransfer

Materialien

Elektroblotting-Apparatur, bestehend aus Pufferkammer mit Platinelektroden, Deckel und Kühlschlange, sowie Einspannsiebe aus Plastik, "Scotchbritt"-Schwämmen (3M Company).

Whatmanpapier 3M (Kontron, Heidelberg), 6 Stück à 20x25 cm.

Transfermembran (Genescreen, NEN, Dreieich) 20x25 cm.

Blottingpuffer:

Na-P-Puffer. (0,5 M)	175 ml	(25 mM)
Aqua bidest.	ad 3,5 l	

Durchführung

- (1) Transfermembran und Whatmanpapiere werden mit Blottingpuffer getränkt. Die obere Glasplatte wird vorsichtig abgenommen und die feuchte Transfermembran aufgelegt. Darüber werden 3 Whatmanpapiere und ein Scotchbritt-Schwamm gelegt.
- (2) Die Anordnung wird gedreht und die Glasplatte vorsichtig entfernt, auf die freigelegte Seite werden die restlichen durchfeuchteten Papiere und ein zweiter Schwamm aufgelegt. Es dürfen keine Luftblasen zwischen Gel, Transfermembran und Whatmanpapier eingeschlossen sein. Dieses "Sandwich" wird durch die Einspannsiebe zusammengehalten und

so in die Blottingkammer geschoben, daß sich die Transfermembran auf der Seite der Anode (+) befindet.

- (3) Die Blottingkammer wird mit Blottingpuffer gefüllt, es wird 1 h ein Strom von 0,5 A, eine weitere Stunde von 1,5 A angelegt. Der Elektrotransfer findet im Kühlraum statt, die Puffertemperatur wird durch einen Kühlinkubator niedrig gehalten.
- (4) Die Transfermembran wird aus dem Sandwich entfernt, zwischen Papiertücher und zwei Glasplatten geklemmt und 2 h bei 80°C unter reduzierter Atmosphäre "gebacken". Die Nukleinsäure wird an die Membran gebunden und das Glyoxal entfernt.

4.6.3.2 Northern Hybridisierung

Materialien

Meßzylinder aus Plastik, 100 und 250 ml mit passendem Silikonstopfen
Hybridisierwärmeschrank (Bachofer, Reutlingen).

Stammlösung SSC (20x):

NaCl	175,2 g	(3 M)
tri-Na-Citrat	88,23 g	(0,3 M)
Aqua bidest.	ad 1 l	

Es wird mit 1 M NaOH ein pH von 7 eingestellt, der Puffer autoklaviert und bei RT gelagert.

Formamid wird zweimal bei 0°C umkristallisiert und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wird die Flüssigkeit mit Mixed Bed Resin (BioRad) nochmals deionisiert.

SDS-Lösung (10%)

Denhardt's-Lösung (100x):

PVP 40T (Sigma)	1 g	(2%)
Ficoll 400 (Sigma, F 4375)	1 g	(2%)
BSA (Sigma, A 7638)	1 g	(2%)
Aqua bidest.	ad 50 ml	

Die Stammlösung wird sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

PVP= Polyvinylpyrrolidon

BSA= Rinderserumalbumin

t-RNA von E. coli, gelöst in H₂O bidest. 25 mg/ml, bei -20°C gelagert.

Hybridisierpuffer:

Formamid (deion.)	10 ml	(50%)
SDS-Lsg. (10%)	2 ml	(1%)
Denhardt's-Lsg.	0,2 ml	(0,02%)
t-RNA E.coli	0,2 ml	(250 ug/ml)
SSC (20x)	5 ml	(5x)
Aqua bidest.	ad 20 ml	

Durchführung

- (1) Die getrocknete Transfermembran wird locker gerollt und in den Meßzylinder gesteckt, der mit einem Silikonstopfen verschlossen wird.
- (2) Die Vorhybridisierung erfolgt mit 15 ml Hybridisierpuffer, dies entspricht 33 µl pro Quadratcentimeter Membran. Eine waagrechte Rollvorrichtung dreht die festgeklebten Plastikzylinder in einem temperierten Wärmeschrank. Nach 3-6 h bei 75°C wird der Hybridisierpuffer abgegossen.
- (3) Die radioaktiv markierte SP6-RNA ($6-8 \times 10^6$ cpm/Membran) wird mit 500 µl Hybridisierpuffer vermischt, durch Kochen 90 sek denaturiert und im Eisbad abgeschreckt. Die Probe wird mit den restlichen 4,5 ml Hybridisierpuffer vermischt, zur Membran pipettiert und der Meßzylinder verschlossen. Die Hybridisierung erfolgt 16 h bei 75°C.

- (5) Der Hybridisierungspuffer wird abgossen, die nicht spezifisch gebundenen Nukleinsäuren werden durch anschließende "Waschungen" von der Membran entfernt.

Waschlösung A:

SSC (20x)	10 ml	(2x)
Aqua bidest.	ad 100 ml	
2 mal 5 min bei RT mit je 50 ml.		

Waschlösung B:

SSC (20x)	10 ml	(2x)
SDS-Lsg. (10%)	5 ml	(0,5%)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Die Lösung wird vor Gebrauch auf 75°C erwärmt.
2 mal 30 min bei 75°C mit je 50 ml.

Waschlösung C:

SSC (20x)	0,5 ml	(0,1x)
Aqua bidest.	ad 100 ml	
2x 30 min bei RT mit je 50 ml.		

- (6) Die Membran wird aus dem Meßzylinder entnommen, mit Papiertüchern abgetupft, in Plastikfolie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm bei RT exponiert; bei schwachen Signalen erfolgt die Autoradiographie mehrere Tage mit einer Verstärkerfolie (Cronex, Quanta III) bei -80°C.

4.6.3.3 Nachweis mit Dot-Blot-Hybridisierung

Die PSTVd-RNA von (+)- und (-)Polarität kann auch ohne elektrophoretische Trennung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und durch molekulare Hybridisierung nachgewiesen werden. Der Auftrag der denaturierten Nukleinsäuren erfolgt in die Löcher einer Dot-Blot-Apparatur. Mit kleinen Verdünnungsschritten können geringe Unterschiede im Viroidgehalt der Proben sichtbar gemacht werden.

Durchführung

- (1) Die Nukleinsäuren werden nach Extraktion durch Phenol und Fällung mit Ethanol in bidestilliertem, sterilem Wasser in der gewünschten Konzentration aufgenommen. 50 µl davon werden mit 50 µl Denaturiermix vermischt und 20 min bei 60°C inkubiert. Der Denaturiermix besteht aus 1 Volumen Formaldehyd (37%) und 1 Volumen 0,5 M Na-P-Puffer. Die Proben werden im Eisbad abgeschreckt.
- (2) Währenddessen werden die Transfermembran (Amersham, Hybond N, RPN 1210N) und drei Whatmann 3 M Papiere (9x13 cm) in 2x SSC-Puffer äquilibriert und in die "Hybridot"-Apparatur (Gibco/BRL) eingespannt.
- (3) Für die Verdünnungsreihe werden 7 Eppendorfhütchen mit je 100 µl 2x-SSC-Puffer gefüllt und nebeneinander aufgereiht. In das Gefäß mit der denaturierten Probe werden 86,6 µl 2x-SSC-Puffer pipettiert und gut gemischt. Aus diesem Gemisch werden 86,6 µl entnommen, in das erste vorbereitete Eppendorfhütchen überführt und gemischt. Darauf werden 86,6 µl entnommen, in das zweite Hütchen überführt, gemischt usw.. Aus dem letzten Hütchen werden 86,6 µl entnommen und verworfen. Die Proben der Verdünnungsreihe bestehen aus jeweils 100 µl Probe, der Verdünnungsfaktor entspricht $10^{1/3}$.
- (4) Die Proben werden nacheinander in aufsteigender Verdünnung in die Bohrungen der Apparatur aufgetragen. Anschließend werden sie mit leichtem Unterdruck in die Membran gesaugt, die Löcher nochmals mit 300 µl 2x SSC nachgespült.
- (5) Die Membran wird kurz an der Luft getrocknet und 2 h bei 80°C "gebacken". Die molekulare Hybridisierung und Waschung erfolgt wie oben beschrieben.

4.7 Präparative Auftrennung von zirkulärer Viroid-RNA durch bidirektionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Aufreinigung von zirkulärer PSTVd-RNA aus s-RNA in einem bidirektionalen Gelelektrophoresesystem nutzt die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der zirkulären Viroid-RNA unter nativen und denaturierenden Bedingungen. Das Verfahren wurde von Schumacher et al. (53) zum Nachweis von zirkulärer Viroid- und Virusoid-RNA in Pflanzenproben verwendet. Bei der Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen wird die Viroid-RNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Unter denaturierenden Bedingungen entfaltet sich das stark basengepaarte, zirkuläre Molekül und wird in seiner Wanderungsgeschwindigkeit gebremst. Alle linearen, gleichlangen Nukleinsäuren behalten jedoch ihre Geschwindigkeit bei, sie werden durch die erhöhte Temperatur sogar beschleunigt und überholen das zirkuläre Viroid.

Erste Richtung unter "nativen" Bedingungen:

(1) Gellösung:

PAA-Lösung 1	10 ml	(5%)
TBE-Lsg. (1 M)	1,35 ml	(22,5 mM)
APS-Lsg. (10%)	256 µl	
Aqua bidest. (steril)	ad 60 ml	

Die Polyacrylamid-Lösung wird gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 44 µl TEMED gestartet. Die Lösung wird in den Hohlraum zwischen zwei Glasplatten (20x25 cm) gegossen, die, mit 1,5 mm Abstandhaltern versehen, in eine Gelgießapparatur eingespannt sind. Ein Kamm mit analytischen bzw. präparativen Taschen wird eingesteckt. Nach 30 min ist die Polymerisation abgeschlossen, das Gel wird in die vertikale Halterung einer Elektrophoreselaufapparatur eingespannt und die Pufferwannen mit 22,5 mM TBE Puffer gefüllt. Zur gleichmäßigen Wärmeleitung wird eine Aluminiumplatte auf die Glasplatten geklemmt.

- (2) Die zuvor in TBE-Probenpuffer ("nativ") gelösten Proben werden in die Probentaschen des Gels aufgetragen. Zwischen den Elektroden wird eine Spannung von 600 V angelegt, die Leistung auf 12 W begrenzt.

Dies entspricht 29 mA zu Beginn, die im Verlauf auf 20 mA abfallen. Nach ca. 1 h bei RT ist der Bromphenolblau-Marker durch das Gel gelaufen, der Stromkreis wird unterbrochen.

- (3) Das Gel wird aus der Apparatur genommen, die obere Glasplatte vorsichtig abgehoben.
- (4) Direkt unterhalb und 4,5 cm oberhalb des Xylencyanol-Markers wird das Gel quer durchgeschnitten, das ausgeschnittene Stück quer aufgerollt und in gleicher Orientierung am untersten Rand einer neuen vorbereiteten Glasplatte wieder ausgerollt. Die leicht eingefetteten Spacer werden angelegt, die 2. Glasplatte (Öhrchenplatte) wird aufgelegt und das Ganze erneut in die Gelgießapparatur eingespannt.

Zweite Richtung unter "denaturierenden" Bedingungen:

- (5) Gellösung:

PAA-Lösung 1	10 ml	(5%)
TBE (1 M)	1,35 ml	(22,5 mM)
Harnstoff	28,8 g	(8 M)
Aqua bidest.	18 ml	

Die Mischung wird erwärmt, bis der gesamte Harnstoff gelöst ist, dann folgt die Zugabe von:

APS (10%)	256 μ l
Aqua bidest.	ad 60 ml

- (6) Die Lösung wird über ein Papierfilter von ungelösten Harnstoffresten gereinigt. Nach Zugabe von 44 μ l TEMED und kurzem Mischen wird die Lösung sofort in die vorbereitete Apparatur auf den Gelstreifen gegossen und bis zum Rand der "Öhrchenplatte" aufgefüllt.
- (7) Nach der Polymerisation werden die Glasplatten wieder mit der Aluminiumplatte versehen und in die vertikale Laufapparatur geklemmt. In die Pufferwannen wird auf ca. 50°C erwärmter 22,5 mM TBE-Puffer gefüllt und die gesamte Apparatur in den Wärmeschrank bei 50°C gestellt. Da die Laufrichtung nun entgegengesetzt ist, die Nukleinsäuren nun nach oben in die Gelmatrix aufgetrennt werden, müssen die Anschlüsse an der Laufapparatur vertauscht werden! Die Bedingungen der Elektrophorese bleiben gleich: 600 V, 12 W begrenzend.

- (8) Der Lauf wird beendet, wenn der Xylencyanol-Farbstoff ganz nach oben durch das Gel gewandert ist.
- (9) Die Glasplatten werden entfernt, das Gel wird mit Ethidiumbromid in einer sterilisierten Glaswanne angefärbt. Die unterste scharfe Bande enthält die zirkuläre Viroid-RNA. Sie wird aus dem Gel ausgeschnitten und durch Isotachophorese zurückgewonnen.

4.8 Elution von Nukleinsäuren aus Gelen

Elution mittels Isotachophorese bedient sich, wie die Gelelektrophorese, der Wanderungseigenschaften von Nukleinsäuren im elektrischen Feld. Die aufgereinigte Nukleinsäure wird jedoch nicht, wie bei der herkömmlichen Elutionsmethode, aus dem ausgeschnittenen Gelstreifen in den von einer Dialysemembran umschlossenen Flüssigkeitsraum eluiert, sondern in die puffergefüllte Matrix einer Sephadexsäule. Durch Auflagerung eines Puffers mit langsam wandernden Anionen auf das Puffersystem des Säulenmaterials mit schnellwandernden Anionen (Cl^-) entsteht in der Säulenmatrix beim Anlegen eines elektrischen Felds eine Ionenlücke. In diese Lücke wandern die aus dem Gelstück eluierenden Nukleinsäuren. Die Nukleinsäurefront, die sich im elektrischen Feld konzentriert und zur Anode wandert, kann durch den gleichschnell wandernden Farbstoff Phenolrot leicht sichtbar gemacht werden. Dieses Elutionssystem, die "Isotachophorese", wurde von Öfverstedt et al. (54) beschrieben, von M. Tabler (77) vereinfacht und für den Gebrauch im Labor etabliert.

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen kann "Gene-cleanTM" eingesetzt werden. Agarose und DNA lösen sich nach Erwärmen in hochkonzentrierter Natriumjodid-Lösung. DNA wird dabei stark an Glas gebunden, während Agarose in Lösung bleibt. Vogelstein und Gillespie (55) zeigten, daß die DNA-Bindungskapazität bei Glaspulver im Vergleich zu Glasoberflächen erheblich größer ist. Unter hohen Salzbedingungen bleibt die DNA gebunden, sie kann jedoch bei niedrigen Salzbedingungen durch Erwärmen wieder quantitativ abgelöst werden.

4.8.1 Elution durch Isotachophorese

Materialien

Econosäulchen 0,7 mm Durchmesser und 4 bzw. 10 cm lang (Bio-Rad, 737-1212; 737-1222), Dreiwegehahn, einzeln steril verpackt (Unoplast Hundested, Dänemark, 771.23.000), und Dialysemembran (nach "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" von Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, vorbehandelt und autoklaviert im Kühlschrank gelagert).

Sephadex G-50 fine (Pharmacia, 17-0042-01) läßt man nach Vorschrift von Pharmacia vorquellen und autoklaviert es in bidestilliertem Wasser. Es kann bei RT aufbewahrt werden. Vor Versuchsbeginn gibt man die benötigte Menge in eine Saugflasche und legt Unterdruck an.

Eine sterile 40 mM Tris/HCl-Lösung mit pH 8,3 wird hergestellt, die gelöste Luft durch Unterdruck entfernt.

100 mM 6-Amino-n-Capronsäure (Sigma, A 2504) wird immer frisch in sterilem H₂O bidest. gelöst, die ebenfalls gelöste Luft mit Unterdruck entfernt.

Phenolrot (Sigma, P 4758), in der Amino-n-Capronsäurelösung (ca. 1 mg/ml) gelöst.

Durchführung:

- (1) Das Econosäulchen (Bio-Rad) wird mit der entgasten Sephadex-G-50-Lösung bis zur oberen Erweiterung gefüllt und die Sephadexmatrix mit dem ebenfalls entgasten Tris/HCl-Puffer durch 3-maliges Auflagern und Durchlaufenlassen des Tris/HCl-Puffers durch die Sephadex-Säule äquilibriert. Die untere Öffnung des Säulchens wird mit einem Dreiwegehahn (Unoplast) verschlossen.
- (2) Der Dreiweghahn besitzt einen Einlaß, einen seitlichen Auslauf und einen unteren Auslauf; dieser Auslauf wird mit einer Dialysemembran durch einen übergestülpten Silikonschlauch verschlossen. Der Hohlraum im Hahn über der Membran wird mit dem 40 mM Tris/HCl-Puffer gefüllt, wobei keine Luftbläschen im Hahn zurückbleiben dürfen.
- (3) Der überschüssige Puffer auf der Sephadexmatrix kann nun durch den seitlichen Auslauf abgelassen werden. Nach dem Einsickern des Puf-

- fers in das Säulenmaterial wird der Hahn so umgestellt, daß die Flüssigkeit mit der Dialysemembran verbunden ist.
- (4) Das ausgeschnittene Gelstück wird oben auf das Sephadex gelegt, dazu pipettiert man ca. 5 μ l der Phenolrot-Lösung. Das Ganze wird mit der Amino-Caprone-Lösung beschichtet.
 - (5) In diesen oberen Pufferraum wird die Kathode gesteckt. Das untere Ende mit dem Dreiweghahn taucht man in ein Becherglas mit Tris/HCl-Puffer. Darin befindet sich die Anode.
 - (6) Je nach Länge des Säulchens wird eine Spannung von 100 (4 cm) bzw. 200 V (10 cm) angelegt. Der Farbmarker konzentriert sich zu einer scharfen Bande, die langsam zur Anode wandert, die aus dem Gelstück eluierende Nukleinsäure befindet sich in einer Bande direkt vor der Farbfront.
 - (7) Wenn die Farbfront ungefähr 5 mm von der Glasfritte entfernt am unteren Ende der Sephadexsäule angekommen ist, wird der Stromkreis unterbrochen, der Dreiweghahn abgenommen. Die Tropfen werden in einem Eppendorfgefäß aufgefangen, bis das Phenolrot eluiert.
 - (8) Wenn das eluierte Gelstück Ethidiumbromid enthielt, wird das gesammelte Eluat mit Phenol und Chloroform extrahiert und erst dann mit Na-Perchlorat/Isopropanol oder Na-Acetat/Ethanol gefällt. Der Farbstoff Phenolrot ist in Alkohol löslich und wird während der Fällung abgetrennt. Das Pellet wird gewaschen und getrocknet und kann anschließend in entsprechendem Puffer aufgenommen werden.

4.8.2 Elution mit "Gene-clean"

Bei den Agarosegelen ist das Tris/Acetat/EDTA-(TAE)-Puffersystem einem Tris/Borat/EDTA-(TBE)-Puffersystem vorzuziehen. Es kann normale oder "low melting"-Agarose verwendet werden. Für DNA-Moleküle, die kürzer als 100 Basen sind, liegt die Ausbeute oft bei weniger als 50%, die DNA ist nur schwer wieder von der Silicamatix zu entfernen.

Lösungen:

Gene Clean™-Kit (Bio 101, La Jolla, California, 92038-2284):

- Gesättigte Natriumjodid-Lösung.

- "NEW-Waschlösung": 7 ml konzentrierte Lösung aus NaCl, Tris und EDTA: 7 ml NEW-Stammlösung werden mit 140 ml H₂O bidest gemischt. Danach werden 155 ml 100% Ethanol p.a. zugegeben. Die NEW-Waschlösung wird in einer Glasflasche bei -20°C aufbewahrt und darf sich während des Gebrauchs auf höchstens +4°C erwärmen.

"Glassmilk": Silicamatrix, suspendiert in Wasser, bei 4°C aufbewahrt.

Elutionspuffer: TE-Puffer oder bidestilliertes Wasser.

Durchführung:

- (1) Das Gewicht des ausgeschnittenen Agarosestücks wird in einem Eppendorfgefäß (evtl. 14 ml-Greiner-Röhrchen) bestimmt. (Keine Glasgefäße benutzen!)
- (2) Es wird das Volumen an NaI-Lösung zugegeben, das dem 2-3fachen Gewicht des Agarosestückchens entspricht. Das Gefäß wird 1-3 min bei 45-55°C inkubiert, leicht geschüttelt und in das Wasserbad zurückgestellt. Nach weiteren 5 min sollte das Agarosestückchen aufgelöst sein.
- (3) Zu dieser Lösung wird die "Glassmilk" gegeben. Die Silicamatrix muß zuvor im Aufbewahrungsgefäß durch Vortexen resuspendiert werden. Die zuzugebende Menge richtet sich nach der Menge an DNA, die gefischt werden soll. 5 µl reichen bis 5 µg DNA aus, für größere Mengen werden pro zusätzlichem µg DNA weitere 2 µl "Glassmilk" benötigt.
- (4) Die Mischung wird geschüttelt und 5 min im Eisbad inkubiert, die Silicamatrix durch kurze Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Auf diese Weise kann die DNA auch von Protein, RNA, SDS und Phenol/Chloroform abgetrennt werden. Falls nicht die gesamte Agarose gelöst war, kann nochmals NaI-Lösung zugegeben und auf 45-55°C erhitzt werden.
- (5) Das weiße Pellet wird mit "Waschlösung NEW" in 10-50fachem Volumen der zugegebenen "Glassmilk" gewaschen. Dies kann durch kräftiges Vortexen oder durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausblasen mit einer

- Eppendorfpipette erfolgen. Die Suspension wird zentrifugiert, der Überstand entfernt; der Waschvorgang kann wiederholt werden.
- (6) Der Überstand wird zuletzt sorgfältig entfernt, erneut zentrifugiert und der Restüberstand abgesaugt.
 - (7) Die Ablösung der gereinigten DNA erfolgt durch Wasser oder Niedrigsalz-Puffer. Es werden ca. 10 µl zur Glasmatrix pipettiert und 2-3 min bei 45-55°C inkubiert, anschließend wird 30 sek zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, der Vorgang wiederholt, die Eluate werden vereinigt.

4.9 Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft aus Einzelpflanzen von Tomate *Lycopersicon esculentum* "Rentita"

Die von Martin Tabler entwickelte Methode (56) ermöglicht es, die Nachkommenschaft von PSTVd-Molekülen in einer einzelnen infizierten Tomatenpflanze durch Sequenzierung zu bestimmen. Die Nukleinsäuren aus sich entwickelnden Blättern werden extrahiert, die Viroid-RNA wird anschließend durch Fraktionierung mit 2 M LiCl angereichert und die erhaltene LiCl-lösliche RNA (s-RNA) wird weiter über das bidirektionale Gelsystem aufgetrennt. Die aufgereinigte zirkuläre Form der PSTVd-RNA durch Isotachophorese aus dem Gelstreifen zurückgewonnen.

Durch thermisches Aufschmelzen werden die stark basengepaarten Bereiche des Viroidmoleküls geöffnet, beim Abkühlen kann sich ein im Überschuß zugegebener am 5'Ende mit [^{32}P] radioaktiv markierter DNA-Primer in einer Konkurrenzreaktion an die ihm komplementäre Stelle im Viroidmolekül anlagern ("Annealingreaktion"). Das Oligonukleotid wird durch die Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) enzymatisch verlängert, die Viroid-RNA in cDNA "überschrieben". Der entstandene PSTVd-komplementäre DNA-Einzelstrang mit radioaktiv markiertem 5'Ende kann direkt nach der Methode von Maxam und Gilbert (57) sequenziert werden.

4.9.1 Gewinnung von PSTVd-cDNA durch Reverse Transkription

4.9.1.1 Ansatz zur Sequenzierung

- (1) Markierung der Sequenzierprimer am 5'Ende.

Ansatz für 6-8 Reaktionen:

Primer (1 OD/ml)	5 ul
gamma-[³² P]-ATP	15 ul
Kinasepuffer (10x)	2,2 ul
T ₄ -Polynukleotidkinase	2 ul

Die Reaktion ist bei 37°C nach 20 min beendet. Die Kinase wird durch Erhitzen (10 min; 65°C) inaktiviert.

- (2) Die aufgereinigte und eluierte zirkuläre PSTVd-RNA wird in 60 ul sterilem Aqua bidest. gelöst. 20 ul davon (dies entspricht ca. 133 mg Blattmaterial) und 3-5 ul markierter Primer werden gemeinsam durch Ethanol/Na-Acetat gefällt (20 min; -80°C).

- (3) Das "gewaschene", trockene Pellet wird in 10 ul 100 mM Tris, pH 8,3 gelöst und im Wasserbad inkubiert:

Primer Se 3 und Se 5	4 min; 80°C
Primer Se 2	2 min; 100°C

Die Proben werden sofort im Eisbad abgeschreckt und 5 min inkubiert.

- (4) Man erwärmt die "Annealingreaktion" auf RT.

Ansatz:

PSTVd-Primer	10 ul
M-MLV-Puffer (2x)	10 ul
M-MLV Rev.Transkriptase	2,5 ul
(300 Einheiten, Gibco/BRL)	

-2x M-MLV-Puffer (frisch angesetzt):

"2x M-MLV Salzmix"	76 ul	(2,64x)
dNTP's (10 mM)	16 ul	(1,6 mM)
Actinomycin D	8 ul	(200 ug/ml)
(Stlsg.: 2,5 mg/ml)		

- "2x M-MLV Salzmix":

KCl (2 M)	40 μ l	(105,6 mM)
MgCl ₂ (1 M)	12 μ l	(15,8 mM)
BSA 50 mg/ml	4 μ l	(264 μ g/ml)
DTT (1 M)	2 μ l	(2,64 mM)
Aqua bidest.	ad 760 μ l	

4.9.1.2 Ansatz zur Klonierung

- (1) Ein Teil des Primers P1 wird am 5'Ende mit Polynukleotidkinase radioaktiv markiert, um die synthetisierte PSTVd-cDNA später im Gel durch Autoradiographie sichtbar machen zu können.
- (2) Radioaktiv markierter (20 μ l Kinaseansatz) und nicht markierter Primer P1 (30 μ l (1 00/ml)) werden zusammen mit ca. 2 μ g zirkulärer PSTVd-RNA mit Ethanol/Na-Acetat gefällt (30 min; -80°C). Die Primer-DNA (2 μ g) liegt im 25fach molaren Überschuß zur PSTVd-RNA vor.
- (3) Das Pellet wird in 15 μ l 100 mM Tris/HCl pH 8,3 gelöst, 2 min bei 100°C gekocht, im Eisbad abgeschreckt und 5 min inkubiert.
- (4) Das Eppendorfcap wird auf RT erwärmt.

Ansatz:

PSTVd/Primer	15 μ l
M-MLV-Puffer(2x)	15 μ l
M-MLV Rev.Transkriptase	2,5 μ l

Puffer für Reverse Transkription wie in 4.9.1.1

4.9.1.3 Synthese der cDNA

- (1) Bei beiden Ansätzen erfolgt die Reaktion 1 h bei 37°C .
- (2) Der Verdau des RNA-Templates erfolgt mit 1 ng RNase A: 1 μ l (Stamm-
lösung 1 μ g/ml) 2 min bei 37°C . Das Volumen wird mit 80 μ l TE-Puffer
vergrößert und mit Extraktionsphenol extrahiert, die wäßrige Phase
wird mit Chloroform/Isoamylalkohol nachextrahiert.

- (3) Das Probenvolumen wird durch das Nettogewicht des Eppendorfcaps bestimmt. Für die Fällung wird 1 µl Lachssperma-DNA (1 mg/ml) als Carrier dazupipettiert, die cDNA mit Isopropanol/Na-Perchlorat (15 min; RT; evtl. ÜN) gefällt.
- (4) Das Pellet wird in 20 µl "Probenpuffer für Sequenzierung" aufgenommen, zur Längenbestimmung wird ^{32}P -markierter Hinf-Marker (ca. 50.000 cpm) aufgetragen. Die Proben werden durch Kochen denaturiert (1,5 min; 100°C) und im Eisbad abgeschreckt.
- (5) Die Elektrophorese wird unter den Bedingungen für Harnstoffgelelektrophorese (5% PAGE/22,5 mM TBE/8 M Harnstoff/50°C) im Wärmeschrank durchgeführt und beendet, wenn der Bromphenolblau-Marker zum unteren Rand des Gels gelaufen ist. Die obere Glasplatte wird abgenommen, das Gel auf der Glasplatte in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine passende Röntgenfilmkassette eingelegt. Auf das Gel werden 2 Kodakfilme aufgelegt und bei RT 45-60 min exponiert.
- (6) Die Banden der cDNA, die ungefähr linearer Viroidlänge entsprechen (ab ca. 300 Basen), werden aus einem Röntgenfilm ausgeschnitten. Der Film wird als Schablone benutzt, mit der die entsprechenden Gelstücke aus dem Gel mit einer Skalpellklinge herausgetrennt werden. Zur Kontrolle des Ausschneidevorgangs kann erneut ein Film auf das ausgeschnittene Gel gelegt und 1-2 h exponiert werden.
- (7) Die synthetisierte cDNA wird durch Isotachophorese über eine kurze Säule aus der Gelmatrix eluiert, zum Eluat wird 1 µg Carrier-DNA (M13) gegeben und mit Isopropanol/Na-Perchlorat bei RT (mindestens 15 min) gefällt. Die Radioaktivität des gewaschenen und getrockneten Pellets wird mit dem Cerencov-Meßprogramm bestimmt. Die gewonnenen cDNAs werden direkt für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert oder zur Synthese des Doppelstrangs eingesetzt.

4.10 Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

Die PSTVd-cDNA besitzt am 5'Ende eine radioaktive Markierung. Dimethylsulfat, Hydrazin und Ameisensäure reagieren spezifisch mit Basen der DNA,

Piperidin führt dann bei diesen Modifikationen zum Strangbruch. Die Modifikationsreaktionen sind durch Reaktionsdauer und DNA-Konzentration so gesteuert, daß sie statistisch nur eine Base pro DNA-Strang modifizieren. Genau genommen wird die in Überzahl vorkommende "Carrier-DNA" modifiziert, die geringen Mengen PSTVd-cDNA werden dadurch nur selten "getroffen". Werden die gespaltenen DNA-Stränge, der einzelnen spezifischen Reaktionen in einem Sequenzgel nebeneinander aufgetrennt, entsteht durch die markierten PSTVd-cDNA-Fragmente das typische Leiternmuster, die DNA-Sequenz kann "gelesen" werden.

Durchführung:

- (1) Die gewonnene cDNA wird in 35-40 µl Aqua bidest. gelöst und wie folgt auf die Reaktionen verteilt:

<u>Basenmodifikation</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Bedingungen</u>
G: 4,5 µl	DMS	5 min, RT
G+A: 8 µl	Pip-For	90 min, RT
C+T: 10 µl	Hydrazin	7 min, RT
C: 5 µl	Hydrazin/NaCl	7 min, RT

DMS= Dimethylsulfat und Pip-For= Piperidiniumformiat (1 M, pH 2)

Zu jeder Reaktion wird jeweils 1 µg M13-DNA als "Carrier" gegeben.

- (2) Die Proben werden entsprechend der Vorschrift für die "procedures 10-13" nach Maxam-Gilbert (57) behandelt, gefällt und lyophilisiert.
- (3) In den Abfällen wird DMS mit 5 M NaOH- und Hydrazin mit 2 M FeCl₃-Lösung zerstört.
- (4) Für die zusätzliche T-spezifische Spaltung wird das Protokoll von Rubin und Schmid (58) leicht modifiziert benutzt:

<u>Basenmodifikation</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Bedingungen</u>
T: 5 µl	KMnO ₄	10 min, RT

Die cDNA und die Carrier-DNA werden durch 1 1/2-minütiges Kochen denaturiert und abgekühlt. 20 µl 0,02% Kaliumpermanganatlösung werden zugegeben, die Reaktion wird nach 10 min bei RT durch Zugabe von reduzierter, verdünnter (1:5000) Glyoxallösung (30%) beendet. Nach weiteren 5 min bei RT wird lyophilisiert.

- (5) Nach der Piperidin-Spaltreaktion (30 min; 90°C) werden die Nukleinsäuren lyophilisiert, in H₂O bidest. aufgenommen und erneut lyophilisiert.
- (6) Die getrockneten Pellets werden in 10 µl H₂O bidest. aufgenommen und auf nicht benetzende Filterscheibchen (Millipore, VSWP 29325) pipettiert. Die Filterscheibchen schwimmen auf bidestilliertem Wasser in Petrischälchen. Nach 1 h ist die Dialyse beendet, die Proben werden in neue Eppendorfgefäße pipettiert und durch Lyophilisieren getrocknet. Die Radioaktivität in den einzelnen Proben kann durch Messung mit dem Cerenkov-Programm bestimmt werden.
- (7) Die Proben werden in Probenpuffer für Sequenzgele aufgenommen, 90 sek im kochenden Wasser denaturiert, auf Eis abgeschreckt und in die Taschen eines 5% Sequenzgels (siehe: 4.5.5) aufgetragen.

Dritter Abschnitt: Methoden der Molekularbiologie

4.11 Klonierung von PSTVd-RNA aus Zellkultur M316 und RK46

4.11.1 Herstellen des geeigneten Klonierungs-Vektors

Das Plasmid pHa106 besitzt zwei XmaI Schnittstellen im Sequenzbereich der zentralen konservierten Region der PSTVd-DNA. Bei vollständigem Verdau entstehen zwei Produkte:

1. Der lineare Vektor mit Ampicillinresistenz, SP6-Promotor, T7-Promotor und 21 Nukleotiden der Viroidsequenz sowie 33 Nukleotiden der Vektor-

sequenz.

2. Der herausgeschnittene cDNA-Klon von PSTVd KF440 in Einheitslänge.

Durch den Restriktionsverdau entstehen "klebende Enden", der Vektor kann sich auch ohne Insert wieder schließen. Um diese Verknüpfung zu erschweren, werden die Phosphate am 5'Ende der geschnittenen DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm entfernt.

Vorbehandlung des Plasmids pHal06

- (1) Die Plasmid-DNA pHal06 wird als trockenes Pellet (5 ug) in 100 ul Restriktionspuffer XmaI (1x) gelöst und 5 ul Restriktionsnuklease XmaI (12,5 Units) zugegeben; die Reaktion erfolgt über Nacht bei 37°C.
- (2) Der Restriktionsansatz wird mit 2 ul dazupipettierter Phosphatase (0,4 Units) weitere 30 min bei 37°C inkubiert.
- (3) Zur Inaktivierung der Phosphatase wird Nitrilotriessigsäure (NTA) (Stammlösung: 100 mM) bis zu einer Endkonzentration von 20 mM gegeben und das Reagenzgefäß 30 min bei 65°C inkubiert.
- (4) Es folgt dreimalige Extraktion mit Phenol und abschliessend mit Chloroform/Isoamylalkohol. Die DNA wird mit Isopropanol/Na-Perchlorat bei RT gefällt.
- (5) Nach Zugabe von 30 ul Probenpuffer (für Agarosegele) zum Pellet erfolgt die Auftrennung der Restriktionsfragmente durch Elektrophorese in 1% Agarose/TAE, nach Beendigung der Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung wird das große Fragment aus der Agarose ausgeschnitten und die DNA durch Isotachophorese über eine lange Säule oder mit "Gene-clean" eluiert.
- (6) Das Eluat wird mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, der Überstand mit Isopropanol/Na-Perchlorat gefällt. Das Pellet wird in 50 ul TE-Puffer gelöst, der Vektor ist bereit für das abschliessende Einsetzen der PSTVd-DNA.

4.11.2 Synthese des Doppelstrangs

Der DNA-Primer KL für die Synthese des 2. Strangs besitzt die Sequenz des Viroid-(+)Strangs von Nukleotid 91-125 und ist zum 3'Ende der cDNA, die durch Reverse Transkriptase an den DNA-Primer P1 synthetisiert wurde komplementär. Die Synthese des zweiten Strangs erfolgt mit Klenow-Polymerase. Abschließend wird die doppelsträngige PSTVd-DNA durch die Restriktionsnuklease XmaI an beiden Enden auf Viroideinheitslänge zurechtgeschnitten, gelelektrophoretisch aufgereinigt und in den vorbereiteten Vektor eingesetzt.

Durchführung

- (1) Phosphorylierung des 5'Endes des Rückprimers.

Ansatz:

Primer KL (1 OD/ml)	16 ul	(800 ng)
Kinase-Puffer (10x)	2 ul	(1x)
ATP (10 mM)	2 ul	(0,5 mM)
T4 Kinase	1 ul	

Die Reaktion wird 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend zur Inaktivierung der Kinase 1 min gekocht.

- (2) Für das "Annealing" von Rückprimer KL und Viroid-cDNA wird das Eluat zusammen mit 6 ul (ca. 260 ng) des kinasierten Rückprimers KL mit Ethanol/Na-Acetat gefällt.
- (3) Das Pellet wird in 15 ul 100 mM Tris/HCl pH 8,3 gelöst, die Mischung erhitzt (2 min; 100°C) und im Eisbad abgekühlt.
- (4) Klenow-Reaktion:
- | | | |
|----------------------------|--------|--------------|
| "Annealing-Mix" | 15 ul | (50 mM Tris) |
| dNTP's (10 mM) | 1,5 ul | (0,5 mM) |
| alpha ³² P-dATP | 2,0 ul | |
| Klenow-Salze (3x) | 10 ul | |
| Aqua bidest. | 1,5 ul | |
| Klenow-Polymerase | 2 ul | |

Die Reaktion erfolgt 1 h bei 16°C. Bei 16°C, um zu verhindern, daß sich die cDNA zurückfaltet und dadurch eine verkürzte dsDNA entsteht.

Klenow-Salze (3x):

MgCl ₂	15 mM
DTT	20 mM

- (5) Die Verbindung zwischen dem 3'Ende des neu synthetisierten 2. Strangs und dem 5'Ende des Primers KL am 5'Ende der cDNA wird durch Zugabe von Ligase hergestellt.

Ligaseansatz:

Klenow-Ansatz	30 ul
Ligasepuffer(10x)	3 ul
Aqua bidest.	27 ul
T4-DNA-Ligase	2 ul

Nach 30 min Inkubation bei 37°C wird mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

- (6) Nach der Zugabe von 1 ug M13-ssDNA erfolgt die Fällung mit Isopropanol/Na-Perchlorat, ca. 15 min bei RT.
- (7) Die gefällte PSTVd-DNA wird in 50 ul XmaI-Puffer gelöst, mit 4 ul XmaI (10 units) 2 h bei 37°C, und nach Zugabe von 1 ul XmaI weitere 30 min bei 37°C auf PSTVd-Einheitslänge "zurecht geschnitten".
- (8) Nach der Extraktion mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol werden die Reaktionsprodukte mit Isopropanol/Na-Perchlorat gefällt.
- (9) Das Pellet wird in 20 ul Probenpuffer ("nativ") gelöst und in die Taschen eines "nativen" 5% TBE-Polyacrylamidgels aufgetragen; zusätzlich wird Hinf-Marker, ³²P-markiert (ca. 20-50.000 cpm), aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei RT und wird beendet, wenn der Farbmarker Xylencyanol 3/4 der Laufstrecke zurückgelegt hat. Das Gel wird mit 2 Kodakfilmen mehrere Stunden, evtl. ÜN exponiert.
- (10) Die Bande, die einer Länge von ca. 360 Basenpaaren entspricht, wird ausgeschnitten und die PSTVd-DNA aus dem Gelstück durch Isotachophorese mit einer kurzen Säule eluiert.

4.11.3 Ligation von PSTVd-DNA und pHal06-Vektor-DNA

- (1) Die eluierte PSTVd-DNA wird gemeinsam mit 6 μ l (ca. 600 ng) Vektor-DNA pHal06 durch Isopropanol/Na-Perchlorat gefällt.
- (2) Für die Ligation von Vektor pHal06 und insertierbarer PSTVd-DNA pipettiert man zum Pellet:

Ligaseansatz:

Aqua bidest.	16 μ l
Ligasepuffer (10x)	2 μ l
ATP-Lösung (10 mM)	2 μ l
T4-DNA-Ligase	1 μ l

Zur Kontrolle der Selbstligationsfähigkeit des Vektors werden:

Vektor-DNA pHal06	6 μ l
Aqua bidest.	10 μ l
ATP (10 mM)	2 μ l
Ligasepuffer (10x)	2 μ l
T4-DNA-Ligase	1 μ l

pipettiert. Die Ligation erfolgt im Wasserbad bei 12°C über Nacht. Die rekombinante Plasmid-DNA wird anschliessend direkt aus dem Ligaseansatz genommen und für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen benutzt.

4.11.4 Transformation von *E. coli* JM 83 mit Plasmid-DNA

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Die Aufnahmefähigkeit hängt von der Porengröße der Zellhülle ab, die Aufnahmeeffizienz kann durch lange Inkubation der Zellen mit Ca^{2+} -Ionen (nach Dagert and Ehrlich (59)) oder anderen zusätzlichen Ionen (nach Hanahan (60)), gefolgt von einem Hitzeschock (42°C), entscheidend gesteigert werden. Die Bakterien müssen in der frühen logarithmischen Phase geerntet und während des ganzen Prozesses auf Eis inkubiert werden. Nach längerer Inkubation in der Salzlösung sind sie für Fremd-DNA aufnahmebereit, sie

sind "kompetent" und können direkt zur Transformation eingesetzt oder mehrere Monate bei -80°C gelagert werden (Protokoll nach Hanahan (60)). Nach der Transformation benötigen die Zellen eine Erholungsphase in einem Medium ohne Antibiotikum, damit die für die Ampicillinresistenz benötigten Proteine in den Zellen von der aufgenommenen Plasmid-DNA exprimiert werden können.

Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml):

Bis zur vollständigen Lösung wird 1 M HCl zugegeben, anschließend durch 0,22 μm -Filter sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

YT-Medium:

Caseinhydrolysat	8 g	(0,8%)
Hefeextrakt	5 g	(0,5%)
NaCl	5 g	(85 mM)
Aqua bidest.	ad 1 l	

Die Lösung wird 20 min. bei 121°C autoklaviert.

YT/Amp-Platten:

Für die Herstellung von Selektivagar werden 5 g Agar (Difco, Bactoagar) in 1 l YT-Medium autoklaviert, nach Abkühlen der Lösung ($60-70^{\circ}\text{C}$) werden 10 ml sterile Ampicillin-Stammlösung zugegeben und in Petrischalen zu ca. 20 ml gegossen. Die Platten werden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.11.4.1 Transformation mit Calciumchlorid

CaCl_2 -Lösung (50 mM):

7,4 g CaCl_2 werden in 1 l Bidestwasser gelöst und 20 min bei 121°C autoklaviert.

Herstellung kompetenter Zellen mit Calciumchlorid

- (1) 50 ml YT-Medium werden mit einer Kolonie des *E. coli*-Stamms JM 83 angeimpft, bei 37°C und 220 Upm geschüttelt, die Zellen bis zur optischen Dichte (OD_{600}) von 0,2 angezogen.

- (2) Die Bakterienzellen werden in 50 ml-Falconröhrchen gegossen und zentrifugiert (Minifuge, 5-10 min; 3.000 Upm; RT), das überstehende Medium wird abgegossen.
- (3) Das Pellet wird in 50 ml CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 30-40 min im Eisbad inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wird der Überstand abgekippt und das Pellet in 5 ml CaCl_2 -Lösung aufgenommen. Die Zellen sind nun zur Aufnahme von DNA bereit, sie können bis zu zwei Tage im Eisbad gelagert und zur Transformation eingesetzt werden.

Transformation der Zellen

- (1) Transformationsansatz:

200 µl Bakteriensuspension

7,5 µl Ligaseansatz (Plasmid pHal06/PSTVd DNA)

Kontrolle:

200 µl Bakteriensuspension

7,5 µl Kontrolligation (Vektor pHal06 dephosphoryliert)

werden in sterile Falconröhrchen (15 ml, Polypropylen) zusammenpipettiert, vorsichtig gemischt und 30-40 min im Eisbad inkubiert.

- (2) Die Röhrchen werden 2 min in ein Wasserbad mit 42°C gestellt (Hitzeschock) und anschließend bei RT inkubiert.
- (3) 800 µl YT-Medium werden zugegeben und 30-60 Minuten mit 150 Upm bei 37°C geschüttelt.
- (4) Agarplatten mit YT-Vollmedium und Ampicillin wurden bereits zuvor mit geöffnetem Deckel im "Laminair-Flow" inkubiert, damit das Kondenswasser auf ihrer Oberfläche verdunstet.
- (5) Jeweils 200 µl der Bakteriensuspension werden auf den Selektivagar pipettiert und mit einem Drygalski-Spatel ausplattiert. Wenn die Oberfläche leicht angetrocknet ist, werden die Petrischälchen verschlossen und umgedreht ÜN bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

4.11.4.2 Transformation nach Hanahan

Die Transformationseffizienz bei *E. coli*-Wirtszellen kann durch zusätzliche Salze gegenüber der Calciumchlorid-Methode auf das 100fache gesteigert wer-

den. Die kompetenten Bakterienzellen werden in Aliquots bei -80°C eingefroren und sind nach einer kurzen Auftauphase direkt für die Transformation einsetzbar, eine Anzucht von *E. coli*-Zellen vor der Transformation entfällt. Das folgende Protokoll entspricht dem "Frozen Storage Protokoll III" (60).

SOC-Grundmedium:

Trypton	20 g	(2 %)
Hefeextrakt	5 g	(0,5%)
NaCl	0,6 g	(10 mM)
KCl	18,5 mg	(2,5 mM)
Aqua bidest.	ad 1 l	

Das Grundmedium wird autoklaviert (20 min 121°C) und kann bei RT gelagert werden.

Zu 100 ml Grundmedium werden vor dem Gebrauch noch

MgCl ₂ -Lsg. (1 M)	1 ml	(10 mM)
MgSO ₄ -Lsg. (1 M)	1 ml	(10 mM)
Glucose (2 M)	1 ml	(20 mM)

gegeben. Das Medium (pH 6,8-7,0 stellt sich ein) wird sterilfiltriert und kann bei RT oder im Kühlschrank aufbewahrt werden.

RF1:

RbCl $\times 4\text{H}_2\text{O}$	1,21 g	(100 mM)
MnCl ₂ $\times 4\text{H}_2\text{O}$	0,99 g	(50 mM)
CaCl ₂ $\times 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g	(10 mM)
Glycerin (BRL)	15 g	(15% W/V)
K-Acetat (1 M) pH 7	3 ml	(30 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Der pH wird mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 eingestellt.

RF2:

RbCl $\times 4H_2O$	0,12 g	(10 mM)
CaCl ₂ $\times 2H_2O$	1,1 g	(75 mM)
Glycerin (BRL)	15 g	(15% W/V)
MOPS (0,5 M)	2 ml	(10 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Mit NaOH wird der pH auf 6,8 eingestellt.

MOPS= Morpholino-propan-sulfonsäure.

Die Lösungen werden sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Herstellung kompetenter Zellen

- (1) 1 ml YT-Medium werden mit dem *E.coli*-Stamm JM 83 angeimpft und über Nacht (bis zur stationären Phase) angezogen.
- (2) In einen 300 ml-Kolben werden 30 ml YT- oder SOC-Medium gegeben und mit ca. 1 Promille der Übernachtskultur angeimpft, der Kolben wird bei 37°C und 225 Upm geschüttelt.
- (3) Die Bakterien werden bis zu einer Zelldichte von $4-7 \times 10^7$ angezogen. Dies entspricht einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,8$ für JM 83.
- (4) Je 10 ml der Bakteriensuspension werden in ein Falconröhrchen (15 ml) überführt und 10-15 min auf Eis inkubiert.
- (5) Es folgt eine Zentrifugation in der Minifuge (2500 Upm, 12 min, 4°C).
- (6) Die Zellen werden in 3,3 ml RF1 (entspricht 1/3 des ursprünglichen Volumens) durch leichtes Vortexen resuspendiert und 10-15 min im Eis stehen gelassen. Anschließend wird unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert, der Überstand entfernt.
- (7) Die Zellen werden in 0,8 ml RF2 (entspricht 1/12,5 des ursprünglichen Volumens) resuspendiert und erneut 15 min im Eis inkubiert.
- (8) Der Ansatz wird mit der Glaspipette in 200 µl Portionen auf Falconröhrchen aus Polypropylen (15 ml) verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. (Dabei werden die offenen Gefäße in den Stickstoff gegeben und erst anschließend die Deckel aufgeschraubt).
- (9) Bis zum Gebrauch werden die Zellen bei -80°C aufbewahrt.

Auftauen der Zellen und Transformation:

- (1) Die Zellen werden bei RT aufgetaut und nochmals 10 min auf Eis gestellt.
- (2) Zu den Zellen werden höchstens 10 µl des Ligaseansatzes gegeben, das Röhrchen wird zum Mischen vorsichtig gedreht und weitere 30 min auf Eis inkubiert.
- (3) Der "Hitzeschock" erfolgt 90 sek. bei 42°C.
- (4) Der Ansatz wird 1-2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium folgt eine 1-stündige Erholungsphase im Schüttelschrank bei 37°C und 200 Upm. Falls eine niedrige Transformationsrate erwartet wird, kann die Erholungsphase auf 1,5 Stunden verlängert werden. Die Zellen können zusätzlich durch kurzes Zentrifugieren und Abnehmen von Teilen des überstehenden Mediums noch weiter konzentriert und erst dann plattiert werden.
- (5) Die Zellen werden auf YT/Amp-Platten ausplattiert, die zuvor auf RT erwärmt und im "Lamin-Air" zum Trocknen leicht geöffnet aufgestellt werden. Jeweils 200 µl werden auf einer Agarplatte verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.12 Analyse der rekombinanten Klone

Auf den Agarplatten wachsen nur Bakterien, die ein Plasmid mit Ampicillin-resistenz aufgenommen haben.

Von den Bakterienkolonien, die über Nacht auf den Agarplatten gewachsen sind, werden mit sterilen Zahnstochern flüssige Kulturen in sterilen Reagenzgläsern in 5 ml YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft.

4.12.1 Schnellbestimmung der Plasmidgröße ("Quicktest")

Die flüssigen Übernachtskulturen werden zunächst in einem Schnellverfahren mit Alkali und SDS aufgeschlossen. Während das Plasmid aus den lysierten Zellen im Überstand bleibt, sedimentiert die chromosomale DNA mit den Zelltrümmern. Die Länge des Plasmids wird durch Elektrophorese in Agarose bestimmt. Die Bakterienklone, die ein rekombinantes Plasmid mit Insert be-

sitzen, können durch analytischen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA näher charakterisiert werden.

Durchführung

- (1) Von den flüssigen 5 ml ÜN-Kulturen wird je 1 ml in ein Eppendorfcap überführt, die restlichen Mengen werden im Kühlraum aufbewahrt. Die Proben werden zentrifugiert (5-10 min; 12.000 Upm; 5°C), der Überstand wird abgekippt.
- (2) Die sedimentierten Zellen werden in 200 µl "Cracking-buffer" aufgenommen.

"Cracking-buffer":

NaOH	50 mM
SDS	0,5 %
EDTA	5 mM
Bromphenolblau	0,02 %

Das Pellet wird durch kräftiges Schütteln oder Vortexen mit einem Schüttleraufsatz für Eppendorfcaps (IKA, Vibrax-VBR, Janke und Kunckel) 5-10 min resuspendiert.

- (3) Die lysierten Zellen werden abzentrifugiert (20 min; 12.000 Upm; 5°C).
- (4) Vom Überstand werden vorsichtig 20 µl abgenommen und direkt in die Taschen eines 0,5 % Agarose-Gels aufgetragen, als Längenmarker dient ein ungeschnittenes Plasmid pHa106.
- (5) Das Gel wird in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt und die Plasmidlänge der aufgeschlossenen Klone unter UV-Licht analysiert.

4.12.2 Schnellisolation von analytischen Mengen Plasmid-DNA ("MiniPräp")

Für die analytische Restriktionsanalyse von rekombinanten Bakterienklonen genügt es, die Plasmid-DNA aus 4 ml Übernachtskultur zu isolieren, entweder durch alkalische Lyse nach Birnboim (61), oder durch Kochen nach Holmes and Quigley (62), wobei die Zellen durch Lysozym, Triton und Hitze aufgeschlossen werden. Da die chromosomale DNA an der Bakterienmembran haftet, kann sie zusammen mit den bakteriellen Bruchstücken durch Zentrifugation von der

löslichen Plasmid-DNA abgetrennt werden. Die gewonnene Plasmid-DNA reicht für ca. 8-10 Restriktionsanalysen aus.

TM-Puffer:

Tris/HCl (1 M) pH 8	1 ml	(10 mM)
MgCl ₂ (1 M)	1 ml	(10 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

S-1-Puffer:

Tris/HCl (1 M) pH 8	5 ml	(50 mM)
EDTA (250 mM) pH 8	20 ml	(50 mM)
Saccharose	8 g	(8 % W/V)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Vor Versuchsbeginn wird in der benötigten Menge S-1-Puffer Lysozym in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst

S-2-Puffer:

Tris/HCl (1 M) pH 8	5 ml	(50 mM)
EDTA (250 mM) pH 8	20 ml	(50 mM)
Saccharose	8 g	(8 % W/V)
Triton X-100	10 ml	(10 % V/V)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

S-3-Puffer:

NaCl	2,9 g	(500 mM)
Tris/HCl (1 M) pH 8	1 ml	(10 mM)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Durchführung

- (1) Die Zellen aus der Übernachtskultur werden durch Zentrifugieren (2x 2 ml) in ein großes Eppendorfgefäß (2,2 ml) pelletiert (5-10 min; 15.000 Upm; 5°C).
- (2) Das Pellet wird mit 750 µl TM-Puffer gewaschen und in 75 µl S-1-Puffer auf dem Vortex gelöst.

- (3) Nach ca. 2 min bei RT werden 75 µl S-2-Puffer hinzupipettiert und kurz gemischt, die Reaktionsgefäße gut verschlossen.
- (4) Die Reaktionsgefäße werden genau 45 sek im kochenden Wasser inkubiert und sofort im Eisbad abgeschreckt.
- (5) Nach Zugabe von 750 µl S-3-Puffer wird das Eppendorfgefäß kurz invertiert und 15 min bei 15.000 Upm zentrifugiert.
- (6) Der Überstand wird 1-2 mal mit Extraktionsphenol und danach mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, die Plasmid-DNA durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol aus dem wässrigen Überstand präzipitiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.
- (7) Das trockene Pellet wird in 80 µl TE-Puffer gelöst und kann für Restriktionsanalysen eingesetzt werden. Die gelöste DNA kann bei 4°C aufbewahrt werden.

4.13 Präparative Plasmidgewinnung

4.13.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly

Die Methode (63) beruht auf einer selektiven Denaturierung der hochmolekularen chromosomalen *E. coli*-DNA bei einem pH-Wert von 12,0 bis 12,5. Die zirkuläre, kovalent geschlossene (ccc) Form des Plasmids wird bei diesem pH-Wert nicht denaturiert und bleibt doppelsträngig. Bei der darauffolgenden Neutralisierung renaturiert die *E. coli*-DNA, sie aggregiert zu einem unlöslichen Netzwerk und läßt sich durch Zentrifugation leicht abtrennen. Die Plasmid-DNA verbleibt im Überstand. Die Plasmidpräparation enthält auf diese Weise einen hohen Anteil an ccc-Form, was z.B. für eine Sequenzierung direkt aus dem Bakterienplasmid von Vorteil ist.

Durchführung

- (1) In einen 1 l-Schüttelkolben mit Schikanen im Boden werden 250 ml YT-Medium mit 2,5 ml Ampicillin-Lösung (10 mg/ml) gefüllt. Der Kolben wird mit Bakterien eines Klons von einer Agarplatte oder einer flüs-

sigen Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Upm geschüttelt.

- (2) Am nächsten Morgen befindet sich die Bakterienkultur in der stationären Phase. Man läßt die Bakteriensuspension im Eisbad abkühlen, und zentrifugiert in einem 250 ml-Becher 15 min in der Beckman Zentrifuge mit dem Rotor JA 14 bei 5.000 Upm, 4°C und Bremse 6.
- (3) Die Zellen werden in 100 ml TM-Puffer vollständig resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert; der Überstand wird möglichst vollständig abgekippt.
- (4) Die Zellen werden in 5 ml Lysozym-Puffer resuspendiert, die Suspension wird 10 min bei RT inkubiert.

Lysozym-Puffer:

Glucose (2 M)	1,25 ml	(50 mM)
Tris/HCl (1 M) pH 8	2,5 ml	(50 mM)
EDTA (250 mM) pH 8	2 ml	(10 mM)
Lysozym (Merck)	100 mg	(2 mg/ml)
Aqua bidest.	ad 50 ml	

Da sich das Pellet nur schwer resuspendieren läßt, wird der Zentrifugenbecher auf einen Schüttler mit einem Klemmaufsatz (IKA Vibrax-VBR) gestellt.

- (5) Danach werden 10 ml der frisch zubereiteten alkalischen SDS-Lösung zugegeben:

Ansatz:

SDS (10%)	10 ml	(1%)
NaOH (1 M)	20 ml	(0,2 M)
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Die lysierten Zellen dürfen jetzt nicht mehr stark geschüttelt werden, der Zentrifugenbecher wird nur zweimal gekippt.

- (6) Das Gemisch wird zum Denaturieren 5 min im Eisbad inkubiert.
- (7) Es werden 7,5 ml 3 M Na-Acetat Lösung pH 5 zugegeben, erneut kurz invertiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. (Die chromosomale DNA renaturiert zu einem unlöslichen Präzipitat, während die Plasmid-DNA und niedermolekulare RNA im Überstand bleiben).

- (8) Das Präzipitat wird durch erneute Zentrifugation in der Beckman Zentrifuge (Rotor JA 14; 20 min; 4°C; 8.000 Upm; Bremse 9) abgetrennt.
- (9) Der Überstand wird abgenommen und in einem großen Falconröhrchen mit 0,9 Volumen Isopropanol gefällt; hier muß kein Salz extra zugegeben werden, die verwendeten Puffer enthalten ausreichend Na⁺-Ionen. Es genügt eine Inkubationszeit von 15 min bei RT; die anschließende Zentrifugation erfolgt bei 5.5000 Upm, 15°C, 20 min in der Haereus Christ Zentrifuge. Das Pellet wird im Lyophilisator getrocknet.
- (10) Das trockene Pellet wird in 5 ml RNase-Puffer gelöst.

RNase-Puffer:

Tris/HCl (1 M) pH 7,5	0,5 ml	(10 mM)
NaCl (1 M)	0,75 ml	(15 mM)
Aqua bidest.	ad 50 ml	

Pro Falconröhrchen werden 20 ug DNase-freie RNase A (Boehringer, Mannheim) zugegeben und 1 h bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert.

- (11) Das Volumen wird mit 1 ml 3 M Na-Acetat pH 5,0 und 4 ml H₂O bidest. auf 10 ml erhöht. Um die RNase und andere noch enthaltene Proteine von der DNA abzutrennen, wird zweimal mit 10-15 ml Phenol und abschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.
- (12) Die DNA wird durch Zugabe von 3 Volumen Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt; das notwendige Na-Acetat war bereits zuvor zugegeben worden.
- (13) Die Fällung wird mindestens 1 h bei -20°C inkubiert und in der Haereus Christ Minifuge 20 min bei 4°C und 5.500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert.
- (14) Die Plasmid-DNA im Sediment wird abschließend lyophilisiert und kann gelagert werden. Für die weitere Aufreinigung über einen Cäsium-chloridgradienten wird sie in 2 ml TE-Puffer gelöst.

4.13.2 Reinigung der Plasmid-DNA über einen Cäsiumchlorid-Gradienten

Wird eine Cäsiumchlorid-Lösung in einem Zentrifugenröhrchen bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert, wandert das CsCl-Salz im Schwerfeld nach unten. Gleichzeitig diffundiert es nach oben, in Richtung der niederen Salzkonzentration; es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion ein, es bildet sich ein Dichtegradient im Zentrifugenröhrchen. DNA-Moleküle können aufgrund ihrer Auftriebsdichte, die vom Gehalt an GC-Nukleotidpaaren abhängt, in CsCl-Gradienten aufgetrennt werden: je höher der molare Anteil an GC-Paaren, desto höher ihre Dichte. Neben der Basenzusammensetzung können auch strukturelle Unterschiede zur Auftrennung ausgenutzt werden. Superhelikale DNA-Ringe unterscheiden sich zwar nicht in ihrer Dichte von entspannten, genickten Ringen, die offene, entspannte Plasmidform interkaliert jedoch mehr Ethidiumbromid zwischen die Basenpaare als die geschlossene Plasmid-Superhelix, die offene DNA-Form weist dadurch eine geringere Dichte auf als die geschlossene "supercoiled" Form. Bei einer Trennung der Formen mit ausreichender Menge Ethidiumbromid in einem geeigneten CsCl-Gradienten ist die "ccc"-Form immer die unterste definierte Bande im Röhrchen.

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml in Aqua bidest. gelöst

CsCl-Auffüll-Lösung:

1 g/ml CsCl (Biomol)

80 µl EtBr-Lösung pro ml CsCl-Lösung

(Brechungsindex= 1.3680)

CsCl-gesättigtes Isopropanol: Isopropanol wird mit CsCl versetzt, bis ein unlöslicher Bodensatz zurückbleibt

Durchführung

- (1) Die Plasmid-DNA wird nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) isoliert.
- (2) Die Plasmid-DNA muß vollständig gelöst vorliegen. Zum Lösen der DNA werden 2 ml TE-Puffer zugegeben. Pro ml Lösung wird genau 1 g CsCl eingewogen, gut geschüttelt, bis alles Salz gelöst ist. Pro ml Plasmid-DNA-Lösung werden 80 µl Ethidiumbromid (= 800 µg/ml) hinzu-

pipettiert und gut durchmischt (der Brechungsindex sollte 1.3860 betragen).

- (3) In die Zentrifugenröhrchen, Beckman Quick-Seal (11x32 mm) für den Vertikalrotor VTi 80, werden DNA-Lösung und soviel CsCl-Auffüll-Lösung gegeben, daß etwa 1/3 des Röhrchenhalses gefüllt ist.
- (4) Die Röhrchen werden anschließend austariert (bis 0,01 g), höhere Abweichungen können mit einer CsCl-Lösung höherer Dichte ausgeglichen werden.
- (5) Die Röhrchen werden mit dem Beckman Schweißgerät verschlossen und sorgfältig auf Dichtheit überprüft.
- (6) Zentrifugiert wird 6-12 h bei 70.000 Upm und 20°C im Vertikalrotor Beckman VTi 80.
- (7) Da die DNA das EtBr interkaliert, ist sie durch die Fluoreszenz im UV-Licht zu erkennen. Mit einer UV-Lampe (bei 366 nm) wird das Röhrchen seitlich angestrahlt. Um eine Schädigung der konzentrierten DNA gering zu halten, deckt man die Röhrchen bis zum Abziehen der Plasmid-Bande mit Aluminiumfolie ab. Nach einer Plasmidisolierung mit der Methode von Birnboim ist meist nur eine Bande, die zirkuläre, kovalent geschlossene (ccc)-Form des Plasmids, zu sehen; sind zwei Banden zu erkennen, enthält die unterste die gewünschte ccc-Form des Plasmids.
- (8) Zum Abziehen der Plasmid-DNA-Bande wird das jeweilige Röhrchen in eine Klammer gespannt, die mit einer Muffe an einem stabilen Ständer befestigt ist. Um beim Abziehen der Bande keinen Unterdruck im Zentrifugenröhrchen zu erzeugen, wird eine Kanüle (Luer Nr.1) in den oberen Teil des Röhrchens gebohrt.
- (9) Mit einer zweiten Kanüle (Luer Nr.1), die auf eine 1 ml-Spritze aufgesetzt ist, wird unterhalb der fluoreszierenden Bande die Wand des Zentrifugenröhrchen durchstoßen. Die sedimentierte RNA, die einen Streifen an der Wand des Zentrifugenröhrchens gebildet hat, darf nicht von der Nadel durchbohrt werden.
- (10) Die DNA-Bande wird vorsichtig abgezogen und die Spritze von der Kanüle entfernt; die Nadel bleibt im Röhrchen stecken. Der Inhalt der Spritze wird in ein Eppendorfgefäß überführt.

- (11) Die gewonnene Lösung wird zur Entfernung des Ethidiumbromids mit etwa gleichem Volumen CsCl-gesättigten Isopropanols ausgeschüttelt. Das Isopropanol bildet die Oberphase und wird abgenommen. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis das Ethidiumbromid aus der unteren Phase entfernt worden ist (etwa 2-3 mal).
- (12) Die DNA-haltige Lösung wird zur Entfernung des CsCl in einem Dialyseschlauch mehrere Stunden bei RT gegen ein großes Volumen (5 l) TE-Puffer dialysiert. Der Puffer wird 2 mal gewechselt.
- (13) Die Proben werden in einem großen Eppendorfgefäß mit Na-Perchlorat/Isopropanol 30 min bei RT gefällt und zentrifugiert.
- (14) Die aufgereinigte Plasmid-DNA kann in der gewünschten Konzentration in einem entsprechenden Puffer aufgenommen werden.

4.13.3 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Das Enzym "SequenaseTM" eignet sich zur DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (64). Die Sequenase ist von der T7-DNA-Polymerase abgeleitet und wird aus Bakterienklonen gewonnen, die Untereinheiten des Enzyms überproduzieren. Die verbesserten Eigenschaften für die Sequenzierung sind eine hohe Syntheseleistung, geringe 3'-5'-Exonukleaseaktivität und die Fähigkeit, Nukleotidanaloga einzubauen. Die DNA-Synthese erfolgt in zwei Stufen. Im ersten Schritt, dem "Labelingschritt", wird der angelagerte Primer verlängert. Da die Desoxy-Nukleotide (dNTPs) einschließlich des radioaktiv markierten dATP in limitierender Konzentration zugegeben werden bricht die Synthese nach einiger Zeit ab, die DNA-Ketten erreichen eine Länge von einigen hundert Nukleotiden. Es wurden zudem genügend radioaktiv markierte Nukleotide in die wachsenden DNA-Ketten eingebaut.

Im zweiten Schritt, dem "Terminationsschritt", werden die Produkte dieses Syntheseschritts auf 4 Reaktionsgefäße verteilt. Die Konzentration aller 4 Desoxynukleotide wird gleichmäßig erhöht und jeweils das Didesoxynukleotid (ddNTP) einer bestimmten Base in definierter Menge zugegeben, die DNA-Synthese kann weiterlaufen. Die DNA-Kette wird solange weitersynthetisiert,

bis die Verlängerung durch den Einbau des entsprechenden Didesoxynukleotids abgebrochen wird.

Die vier Reaktionen werden durch Zugabe von EDTA und Formamid gestoppt, die Stränge durch Erhitzen denaturiert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Materialien

Sequenzierungskit SEQUENASE™ von USB (United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio 44122).

Alle Nukleotid-Mischungen werden bei -20°C aufbewahrt und langsam auf Eis aufgetaut. Puffer, Kontroll-DNA und Stopplösung können 4-8 Wochen lang bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Sequenase muß bei -20°C aufbewahrt werden und darf sich nicht erwärmen. Für die Standard-Reaktionen (Lesen bis zu 500 Basen vom Primer ab) wird der "Labeling-Mix" mit bidestilliertem Wasser 1:5 verdünnt. (Die verdünnte Lösung ist bei -20°C einige Wochen stabil).

Kurz vor der Reaktion werden pro Reaktion 2 µl Sequenase 1:8 mit eiskaltem TE-Puffer pH 7,5 verdünnt; das verdünnte Enzym darf nicht länger als 60 min auf Eis aufbewahrt werden.

Radioaktiv markiertes dATP, alpha-[³²P]-dATP (Amersham, 800 Ci/mmol)

Denaturierungspuffer (frisch zubereitet):

NaOH-Lsg. (1 M)	200 µl	(200 mM)
EDTA 80 mM pH 8	2,5 µl	(200 µM)
Aqua bidest.	ad 1 ml	

2 M NH₄-Acetat pH 4,5:

2 Mol NH₄-Acetat werden eingewogen, mit H₂O bidest. gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure eingestellt.

Durchführung:

- (1) Benötigt werden Wasserbäder bei 65°C (im Labor) und 37°C (im Isotopenlabor). Das radioaktive dATP und die Reaktionsgemische werden langsam aufgetaut.

- (2) Die Sequenzierung von Plasmid-DNA macht eine Denaturierung der Doppelstrang-DNA erforderlich:
- Zu 1 μg der in Puffer gelösten Plasmid-Doppelstrang-DNA werden 40 μl Denaturierungspuffer hinzupipettiert, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 4 μl der 2 M NH_4 -Acetat-Lösung pH 4,5 und gleichzeitig 100 μl eiskaltes Ethanol (-20°C) hinzupipettiert, um eine Renaturierung der Doppelstränge zu verhindern.
- (3) Die Fällung erfolgt 10 min bei -80°C . Anschließend wird zentrifugiert (20 min; 4°C ; 15.000 Upm), gewaschen und getrocknet.
- (4) "Annealingschritt" (Anlagerung des DNA-Primers):
- Pro Sequenzierungsansatz genügt eine Annealingreaktion. Ins Eppendorf-Reaktionsgefäß mit der denaturierten Plasmid-DNA werden pipettiert:
- 7 μl Aqua bidest.
 - 1 μl Primer
 - 2 μl Sequenzierungspuffer
- Die Eppendorfgefäße werden 2 min bei 65°C inkubiert. Der Metallblock wird mitsamt den Proben aus dem Wasserbad genommen und auf dem Labortisch langsam auf RT abgekühlt. Unterhalb von 35°C ist das "Annealing" abgeschlossen.
- (5) "Labelingschritt":
- Zu dem Gemisch der Annealingreaktion wird
- | | |
|------------------------------|------------------|
| Primer-Template-Gemisch | 10 μl |
| 0,1 M DTT | 1 μl |
| Labeling-Mix | 2 μl |
| alpha- ^{32}P -dATP | 1 μl |
| verdünnte Sequenase | 2 μl |
- hinzupipettiert, gut gemischt (nicht gevortext), dabei die Bildung von Luftblasen vermieden. Die Reaktion wird 5 min bei RT inkubiert.
- (6) Der folgende Schritt sollte noch vor der Labelingreaktion durchgeführt werden:
- Vier Eppendorfgefäße werden mit G, A, T und C beschriftet. Für die Reaktion mit dGTP werden die Terminationsmischungen in den roten Eppendorfgefäßen benutzt: 2,5 μl des ddGTP Terminations-Mixes werden in das Eppendorfgefäß G pipettiert. Mit jeweils neuer Spitze werden

in die Reaktionsgefäße A T und C entsprechend 2,5 ul ddATP, ddTTP und ddCTP Terminationsmischungen pipettiert. Die Eppendorfgefäße werden verschlossen und mindestens 1 min auf 37°C vorgewärmt.

(7) "Terminationsschritt":

Der Labelingmix, in dem die unterschiedlich verlängerten Primer vorliegen, wird auf die 4 basenspezifischen Terminationsreaktionen aufgeteilt:

je 3,5 ul davon werden in die Gefäße G, A, T und C überführt, wo sich bereits 2,5 ul der entsprechenden Terminationsmischungen befinden, gut gemischt und kurz zentrifugiert. Die Reaktion inkubiert man 5 min bei 37°C. (Die Inkubationsdauer kann auf 30 min ausgedehnt werden).

Dann erfolgt die Zugabe von 4 ul Stopplösung zu jeder Terminationsreaktion, die Gefäße werden gevortext und bis zum Gelauftrag auf Eis aufbewahrt.

Unmittelbar vor dem Auftragen auf das Sequenzgel werden die Proben 2 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und im Eisbad abgeschreckt. Pro Spur werden etwa 2 ul aufgetragen.

4.14 Präparative SP6-Transkription

(1) 20 ug Plasmid-DNA werden in Restriktionspuffer EcoRI gelöst und mit 40 Einheiten EcoRI 4 h bei 37°C linearisiert.

(2) Der Restriktionsverdau wird phenolisiert, die Plasmid-DNA gefällt. Das gewaschene Sediment wird in 100 ul 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 aufgenommen.

(3) Die präparative Transkription wird gestartet:

DNA-Matrize	10 ul
SP6-Puffer (10x)	10 ul
rNTP's (je 10 mM)	5 ul
RNasin (37 Units/ul)	1 ul
Aqua bidest. steril	ad 100 ul

Die Reaktion erfolgt mit ca. 50 Einheiten SP6-Polymerase (Biolabs).

- (4) Nach 3-4 h bei 37°C werden 10 Einheiten RNase-freie DNase zugegeben und die Reaktion nach drei Minuten durch Phenolextraktion gestoppt. Die Aufreinigung der SP6-Transkripte erfolgt über ein Biogelsäulchen (vgl. 4.5.2), die Ausbeute wird durch die Messung des UV-Spektrums bestimmt.

4.15 Biotest

Die SP6-Transkripte werden in 1% K_2HPO_4 -Puffer so gelöst, daß pro Pflanze 1 bzw. 0,1 µg inokuliert werden. Verwendet werden junge Tomatenpflänzchen der Kultursorte "Rentita", die sich im Zweiblattstadium befinden, das heißt, neben den Keimblättern zwei entwickelte Blätter besitzen. Diese Blätter werden mit Carborundum bestäubt, die zu inokulierende RNA wird aufgetropft und die Blattoberflächen werden durch Reiben mit sterilen Glasspateln verletzt. Anschließend werden die Pflänzchen unter fließendem Leitungswasser abgewaschen und bei 24-30°C unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus aufgestellt. Epinastie, Blattverformung und Stauchung, die typischen Krankheitssymptome, lassen sich abhängig von Licht- und Wetterverhältnissen 3-6 Wochen nach Inokulation und erfolgreicher Infektion in den sich entwickelnden Pflanzen beobachten.

5. ERGEBNISSE

5.1 Infektion von Zellen der Wildkartoffel *Solanum demissum* durch Liposomen

Für die *in vitro* Inokulation mit PSTVd-RNA wurden Protoplasten der Zelllinie M384 benutzt, die Kalluszellen der Wildkartoffel *Solanum demissum* entstammt. Von den Kalluskulturen konnten Suspensionskulturen "gestartet" werden, aus denen in kurzer Zeit große Mengen Protoplasten für Inokulationsversuche gewonnen werden konnten. Einigen Stunden nach Entfernen der alten Zellwand und Inokulation der Protoplasten mit PSTVd-RNA bildeten sich neue Zellwände, nach zwei Tagen fanden die ersten Zellteilungen statt und nach wenigen Wochen wurden die normalen Wachstumscharakteristika von Suspensions- und Kalluskulturen erreicht. Gleichzeitig wurde die inokulierte Viroid-RNA in den Protoplasten vermehrt, eine simultane Inokulation in diesem Protoplastensystem schien daher zur Untersuchung früher Stadien der PSTVd-Infektion geeignet.

5.1.1 Herstellung von Protoplasten

Die Protoplastenausbeute wurde zunächst in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Zellkultur bestimmt (Tabelle B).

Vier bis fünf Tage nach Verdünnen der Kultur wird ein gepacktes Zellvolumen (PCV) von durchschnittlich 23% erreicht, mit einer Enzymlösung aus in Osmotikum gelöster Cellulase (1%) und Pectolyase (0,1%) lassen sich $2,3-11 \times 10^5$ Protoplasten pro Milliliter PCV herstellen. Für die routinemäßige Herstellung von Protoplasten wurden Suspensionszellen 4 Tage nach Mediumzugabe benutzt. Die starken Schwankungen bei der Protoplastenausbeute können teilweise auf das Alter der Suspensionskulturen zurückgeführt werden, auch von der Jahreszeit abhängige Schwankungen wurden beobachtet, sind aber eigentlich nicht zu erklären, da die Kulturbedingungen immer konstant gehalten werden. Am dritten und sechsten Tag nach der Verdünnung ist die Ausbeute geringer. Zellkulturen, die direkt nach der Verdünnung (1 Tag) behandelt

wurden und solche, die sehr lange im Kulturmedium wuchsen (7 Tage), erbrachten eine noch geringere Ausbeute an Protoplasten. Der Einsatz von anderen Zellwand abbauenden Enzymmischungen führte nicht zu einer erheblichen Steigerung der Protoplastenausbeute.

Tabelle B: Protoplastenausbeute aus Suspensionszellen, die an verschiedenen Tagen nach Weiterverdünnung der Kulturen hergestellt wurden.

Tage nach Mediumzugabe	erzieltes gepack- tes Zellvolumen PCV	Anzahl Proto- plasten pro ml PCV
1	12%	$1,2 \times 10^5$
3	20%	4×10^5
4	23%	$2,3-11 \times 10^5$
5	26%	$8,9 \times 10^5$
6	30%	$4,1 \times 10^5$
7	30%	$2,5 \times 10^5$

5.1.2 Inokulation von Protoplasten

Protoplasten können mit PSTVd-RNA durch Fusion mit Liposomen inokuliert werden, durch die Zugabe von PEG verschmelzen sie mit der Protoplastenmembran, der Liposomeninhalt wird direkt in das Cytoplasma abgegeben. Diese Inokulationsmethode wurde von Olaf Faustmann (65) zur Infektion von Protoplasten von *Solanum tuberosum* erfolgreich eingesetzt, sie erfordert nur kleine Mengen PSTVd im Inokulum. Bei Protoplasten der Wildkartoffel *Solanum demissum* war mit dieser Methode neusynthetisierte Viroid-RNA bereits nach 3 Tagen nachweisbar (66).

5.2 Bestimmung der Infektionseffizienz

Die exakte Infektionsrate dieser Inokulationsmethode wurde durch die Untersuchung der Nachkommenschaft einzelner Protoplasten auf Viroid-RNA bestimmt. Bei Inokulation mit viraler RNA läßt sich eine erfolgreiche Infektion der Protoplasten anhand von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen virale Proteine an der Zelloberfläche nachweisen (67). Eine Viroidinfektion ist, da keine viroidspezifischen Proteine gebildet werden, nur direkt durch molekulare Hybridisierung nachweisbar; dies ist auf der Ebene der einzelnen Protoplasten nicht möglich, sie müssen wenigstens zu Mikrokalli herangezogen werden.

Die Regeneration von Protoplasten zu teilungsaktiven Zellen erfolgt normalerweise in Flüssigmedium, in dem die Protoplasten absinken oder entsprechend ihrer Dichte schweben. Bei dieser "submersen" Kulturweise lagern sie sich einander an und verwachsen während der Zellregeneration zu traubenförmigen Mikrokalli. Diese Mikrokalli entstehen damit aus einer größeren Anzahl von Protoplasten und können nachträglich nicht voneinander getrennt werden, die Nachkommenschaft einzelner Protoplasten kann in diesen Flüssigkulturen nicht direkt analysiert werden. Deshalb sollten die Protoplasten nach der Inokulation getrennt und zur Regeneration zu mehrzelligen Kalli in einem sich verfestigenden Medium verteilt werden. Als gelierendes Mittel wurde eine besonders aufgereinigte Agarose eingesetzt, da sie auch bei niedrigen Temperaturen (35-40°C) noch flüssig ist (68) und die Protoplasten nicht durch Hitze geschädigt werden.

Für die Regeneration einzelner Protoplasten mußte zunächst die optimale Plattierdichte bestimmt werden, um zu gewährleisten, daß die Mikrokalli aus einzelnen Protoplasten entstehen, in ihrer Entwicklung jedoch nicht durch zu hohe Verdünnung gehemmt werden. Eine Plattierdichte von $0,5-1 \times 10^4$ Protoplasten erbrachte eine geringe Regenerationsrate, die Verdünnung war zu hoch; bei 4×10^4 Protoplasten pro Milliliter regenerierten sie zu einem dichten "Rasen", der die Bestimmung der Regenerationsrate behinderte, die Mikrokalli waren zudem kleiner als bei stärkerer Verdünnung regenerierte Kalli, ein Effekt, der auf die starke Verarmung der Nährstoffe im Regenera-

tionsmedium zurückzuführen sein könnte. Für die folgenden Untersuchungen wurden Plattierdichten von $1-2 \times 10^4$ Protoplasten pro Milliliter gewählt. Zunächst wurde der Einfluß der Phytohormonzusammensetzung im Protoplastenmedium auf die Regenerationsrate untersucht (Tabelle C). Das instabile, natürliche Cytokinin Zeatin wurde durch das stabilere, synthetische Benzylaminopurin (6-BA) ersetzt, als Auxine wurden 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Naphtylessigsäure (NAA) eingesetzt. Im optimierten Protoplastenmedium 8p_m befanden sich 0,1 mg 6-BA, 0,5 mg 2,4-D und 3 mg NAA pro Liter.

Tabelle C: Einfluß der Wachstumshormone 6-BA und 2,4-D auf die Regenerationsrate von Protoplasten in Medium 8p mit 3 mg/l NAA.

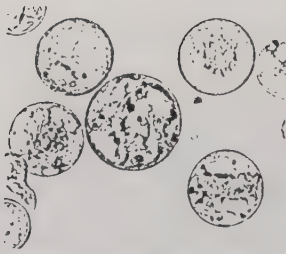
Plattier- dichte	unverändertes Hormon in mg/l	verändertes Hormon in mg/l	Anzahl Mikro- kalli pro ml Kulturmedium (*)	Regenera- tionsrate in %
2×10^4 Ppl/ml	2,4-D: 0,25	<u>6-BA:</u> 0,1	364	1,82
		0,5	63	0,32
		1	30	0,15
		Zeatin: 0,5	125	0,63
1×10^4 Ppl/ml	6-BA: 0,1	<u>2,4-D:</u> 0,1	4	0,04
		0,25	10	0,1
		0,5	55	0,55
		1	9	1,09
2×10^4 Ppl/ml	6-BA: 0,1	<u>2,4-D:</u> 0,1	313	1,56
		0,25	306	1,53
		0,5	257	1,29
		1	227	1,14

(*) Die angegebenen Werte sind Durchschnittswerte. Pro Bestimmung wurden mindestens 2 Kulturschälchen ausgewertet, pro Schälchen wurden jeweils 5 verschiedene Bereiche ausgezählt.

5.2.1 Infektionsrate von PSTVd in Liposomen eingeschlossen

Mit dem für die Regeneration optimierten, agarosehaltigen Protoplasten-medium 8p_m ließ sich die Infektionsrate der Protoplasten in Abhängigkeit vom PSTVd-RNA-Gehalt in den Liposomen bestimmen. Dazu wurden Liposomen präpariert, die unterschiedliche Mengen Viroid-RNA einschlossen. Gereinigte PSTVd-RNA in Mengen von 1, 5 und 25 µg wurde mit t-RNA aus *E. coli* gemischt, um einen Nukleinsäuregehalt von 25 µg pro Liposomenpräparation zu erhalten; als Kontrolle dienten Liposomen, die nur t-RNA aus *E. coli* enthielten. Unter den Standardbedingungen der Inokulation wurden in diesen Versuchen 30, 150 bzw. 750 ng PSTVd-RNA pro 1 Million Protoplasten eingesetzt.

Die Protoplasten wurden nach der Inokulation in Medium 8p_m in einer Konzentration von 3×10^4 Ppl pro Milliliter aufgenommen. Zehn Milliliter davon wurden mit zehn Milliliter 8p_m/Agarose vermischt und auf zwei Kulturdöschen verteilt, die restlichen Protoplasten blieben zur Regeneration zu Suspensionszellen in flüssiger Submerskultur in 8p_m. Abbildung 2 zeigt den zeitlichen Verlauf einer Regeneration von ausplattierten Protoplasten nach erfolgter Inokulation mit PSTVd zu Mikrokalli. Ausgewählte Mikrokalli können dann mittels molekularer Hybridisierung im Dot-Blot auf Gehalt an Viroid-RNA untersucht werden. Durch die Untersuchung von einzelnen, regenerierten Mikrokalli auf Viroidgehalt acht Wochen nach Inokulation mit Liposomen wurde der Prozentsatz der infizierten Protoplasten aus den verschiedenen Inokulationsansätzen bestimmt. Die Nukleinsäuren einzelner Mikrokalli wurden mit Phenol in einer Tüpfelplatte extrahiert, in eine Bohrung einer Dot-Blot-Apparatur aufgetragen und durch molekulare Hybridisierung mit einer PSTVd-spezifischen Sonde nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt und in Tabelle D zusammengefaßt. Mikrokalli mit einem Naßgewicht von 1,5-3 µg genügten zum Nachweis von Viroid-RNA, wie Kallusstückchen der permanent infizierten Zelllinie M316 gezeigt hatten (Ergebnisse nicht gezeigt).



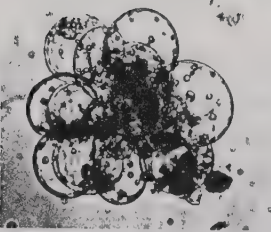
Protoplasten von *Solanum demissum*

→
Inokulation mit
PSTV3-RNA in
Liposomen verpackt



Protoplasten in Agarose eingelagert

↓
1 Woche nach
Inokulation



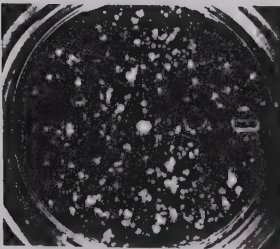
Bildung einer Zellkolonie

←
4 Wochen nach
Inokulation



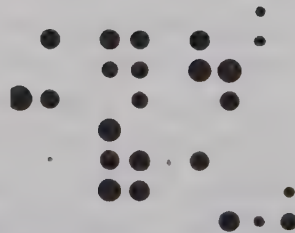
Erste Zellteilung

↓
8 Wochen nach
Inokulation



Mikrocalli

→
RNA extrahiert aus
einzelnen Mikro-
calli



Dot-Blot-Hybridisierung (+)-spezifisch

Abb. 2: Regeneration von einzelnen, inokulierten Protoplasten zu Mikrocalli und anschließender Bestimmung der Infektionsrate.

Abb 2:

Die verschiedenen Stufen der Regeneration wurden anhand mikroskopischer Aufnahmen festgehalten. Die Aufeinanderfolge der Aufnahmen ist durch Pfeile angedeutet.

Die frisch isolierten Protoplasten (Vergrößerung 300x) werden nach Inokulation mit PSTVd-RNA mit Protoplastenmedium auf eine Konzentration von 3×10^4 Ppl/ml verdünnt. Nach Zugabe von Agarose, in Medium gelöst, werden die Zellen in Kulturschälchen gegeben und nach dem Verfestigen der Agarose in ihrer Position fixiert (Vergrößerung 250x). Nach ca. einer Woche können die ersten Zellteilungen beobachtet werden (Vergrößerung 250x), nach vier Wochen wird die Bildung von Zellkolonien deutlich (Vergrößerung 250x). Nach acht Wochen sind die entstandenen Mikrocalli mit bloßem Auge in den Kulturschälchen sichtbar (Makroskopische Aufnahme Faktor ca. 0,8). Ausgewählte Mikrocalli werden durch Dot-Blot-Hybridisierung mit einer (+)-spezifischen RNA-Sonde auf ihren Gehalt an PSTVd untersucht.

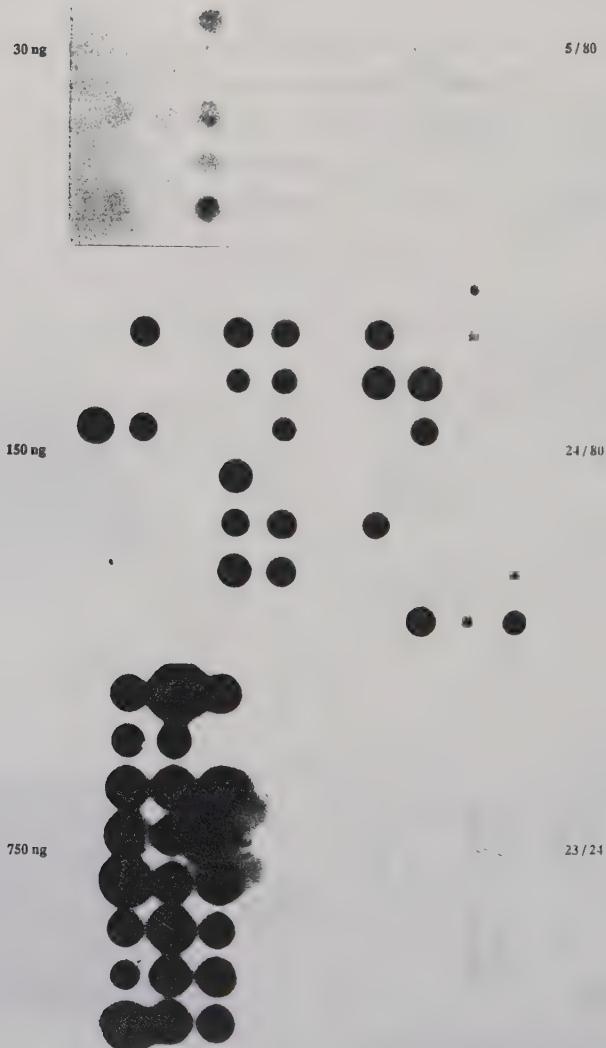


Abb. 3: Infektionsrate bei unterschiedlichen Mengen PSTVd-RNA im Inokulum.

Abb. 3:

Acht Wochen nach Inokulation der Protoplasten mit einer Dosis von 30 bzw. 150 ng PSTVd-RNA pro einer Million Protoplasten wurden jeweils 80 regenerierte Mikrocalli, nach Inokulation mit 750 ng PSTVd-RNA pro einer Million Protoplasten 24 Mikrocalli extrahiert und durch Dot-Blot-Hybridisierung auf Viroidgehalt untersucht. Die Autoradiographie für die Untersuchung bei 150 ng und 750 ng erfolgte 36 Stunden bei Raumtemperatur, die Nitrocellulosemembran für 30 ng wurde 72 Stunden exponiert.

Nach Inokulation der Protoplasten mit 30 ng PSTVd-RNA konnte lediglich bei 5 von 80 untersuchten Mikrocalli Viroid-RNA eindeutig nachgewiesen werden. Die 5fache Menge PSTVd im Inokulum (150 ng) ergab eine Steigerung infizierter Mikrocalli auf 30%, mit 750 ng pro 1 Million Protoplasten konnte eine Infektionseffizienz von über 95% erreicht werden.

Tabelle D: Regeneration von Mikrokalli aus vereinzeltten Protoplasten nach Inokulation mit PSTVd-RNA.

Gehalt PSTVd pro 10 ⁶ Proto- plasten	Anzahl Mikro- kalli pro ml Medium	Regene- rations- rate	Anzahl extra- hierte Mikro- kalli	Anzahl infi- zierte Mikro- kalli	Infek- tions- rate
0 ng	372	2,48%	10	0	0%
30 ng	465	3,1%	80	5	6,3%
150 ng	378	2,52%	80	24	30%
750 ng	195	1,3%	24	23	95,8%
ohne Liposomen	315	2,1%	-	-	-

Eine erfolgreiche Infektion (30%) war mit 150 ng PSTVd-RNA pro 1 Million Protoplasten möglich, mit 750 ng ließ sich die Infektionsrate bei gleicher Protoplastenzahl auf über 90% steigern, die Plattierausbeute sank jedoch überraschend von der durchschnittlichen Rate von 2,55% auf die Hälfte, auf 1,3%. Dieses Absinken der Regenerationsrate war bei submerser Kultur nicht zu bemerken.

5.3 Regeneration von Protoplasten aus Zellen mit permanenter PSTVd-Infektion

Der Einfluß von PSTVd auf die Regenerationsfähigkeit von Protoplasten zeigte sich noch viel deutlicher, wenn Protoplasten der permanent infizierten Zelllinie M316 auf die beschriebene Weise in agarosehaltigem Medium kultiviert wurden; sie regenerierten überhaupt nicht zu Mikrokalli. Wie mikroskopische Beobachtungen zeigten waren sie anscheinend nicht in der Lage, eine Zellwand zu bilden und Zellteilungen zu initiieren, stattdessen schnür-

ten sie "Subprotoplasten" ab, ein Verhalten, das man bei Protoplasten beobachten kann, die Streßsituationen ausgesetzt sind.

Auch die Erhöhung der Protoplastenzahl pro Milliliter führte nicht zur Regeneration teilungsaktiver Zellen; die Blockierung wurde erst durch Anwendung der "bead-type-culture"-Technik (68) zusammen mit einem veränderten Protoplastenmedium (8RP) aufgehoben. Die "bead-type-culture"-Technik verwendet zusätzlich zum agaroseverfestigten Protoplastenmedium flüssiges Medium. Das verfestigte Agarosemedium mit den "eingebetteten" Protoplasten wird nach einigen Tagen in Sektoren geschnitten und durch leichtes Schütteln im Flüssigmedium bewegt, die Protoplasten können dadurch besser mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Das Medium 8RP setzt sich aus den Makro- und Mikroelementen des MS-Mediums (69) zusammen, allerdings ersetzt Glutamin das Ammoniumnitrat als Quelle für reduzierten Stickstoff; weiterhin wird der Inositgehalt auf 200 mg/l verdoppelt und nur die Vitaminmischung des "Kao-Mediums" 8p (70) zugesetzt.

Diese Modifikationen im Protoplastenmedium und in der Kulturweise führten zur Bildung von Mikrocalli aus Einzelprotoplasten der Zelllinie M316. Bei Protoplasten der nicht viroidinfizierten Zelllinie M384 führte diese Veränderung zu einer Verdoppelung der Regenerationsrate, bei einer Plattierdichte von 2×10^4 Protoplasten/ml regenerierten im Durchschnitt 4,4%. Die PSTVd-infizierten Protoplasten von M316 erreichten dagegen immer nur ungefähr ein Zehntel (0,48%) dieser Werte.

5.4 Replikationsverlauf in PSTVd-inokulierten Protoplasten

5.4.1 Nachweis von PSTVd-RNA durch Dot-Blot-Hybridisierung

Von den gleichzeitig regenerierenden, flüssigen Protoplastenkulturen wurden direkt nach der Inokulation (0) und nach 1, 2, 3 und 70 Tagen Proben entnommen und die Nukleinsäuren extrahiert und konzentriert. Aliquots der Proben dieser Zeitreihe wurden verdünnt und in aufsteigender Verdünnung in eine Dot-Blot-Apparatur pipettiert. Die molekulare Hybridisierung erfolgte mit SP6-RNA von (+)- und (-)PSTVd-Polarität (Abb.4).

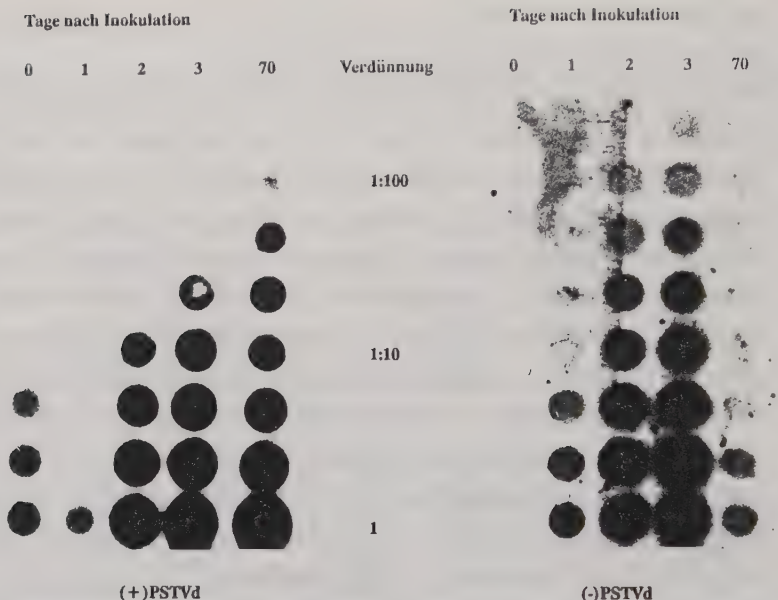


Abb. 4: Nachweis von neusynthetisierter PSTVd-RNA in Protoplasten durch Dot-Blot-Hybridisierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation.

Eine Million Protoplasten wurden mit 750 ng PSTVd inokuliert. Zwei Proben mit je 6×10^4 Protoplasten wurden direkt nach der Inokulation (0) und nach 1, 2, 3 und 70 Tagen entnommen. Die Nukleinsäuren daraus wurden extrahiert, durch Formaldehyd denaturiert und in parallelen Ansätzen die einzelnen Zeitwerte nebeneinander in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 2,154) aufgetragen. Für den einen Ansatz erfolgte die Dot-Blot-Hybridisierung mit einer PSTVd(+)-spezifischen Sonde und für den anderen mit einer PSTVd(-)-spezifischen Sonde. Die Autoradiographie bei -80°C mit der Verstärkerfolie Quanta III dauerte für den (+)PSTVd-Nachweis 1 Woche und für (-)PSTVd drei Wochen.

Ein starker Anstieg von (+)PSTVd in den Zellen ist zwei Tage nach Inokulation nachweisbar, ihm voraus geht die Synthese von (-)PSTVd-RNA, die bereits einen Tag nach Inokulation festgestellt werden kann.

Das zeitliche Auftreten von Viroid- und viroidkomplementärer RNA war in den Versuchsreihen mit Protoplasten, die mit unterschiedlichen PSTVd-Konzentrationen in den Liposomen infiziert worden waren, identisch; die Signalstärken unterschieden sich allerdings, was sich durch die unterschiedliche Anzahl der infizierten Protoplasten erklären läßt (Ergebnisse nicht dargestellt). 750 ng PSTVd-RNA pro 1 Million Protoplasten hatten über 90% der Zellen infiziert; diese RNA-Menge war aber dennoch so gering, daß sich eine PSTVd-Zunahme innerhalb kurzer Zeit in inokulierten Zellen beobachten ließ, ohne von einem zu starken Signal des Inokulums überdeckt zu werden. Vierundzwanzig Stunden nach Inokulation war sogar eine Abnahme der PSTVd-(+)RNA zu bemerken, die Viroid-RNA, die nicht zu einer Infektion geführt hatte, war wahrscheinlich abgebaut worden. PSTVd-komplementäre (-)RNA war dagegen in geringer Menge zu diesem Zeitpunkt bereits nachweisbar. Ein rapider Anstieg der (+)PSTVd-Konzentration begann erst nach zwei Tagen. Noch nach siebenzig Tagen, dem Zeitpunkt, bei dem die Zellen wieder die Wachstumscharakteristika von Suspensionskulturen besaßen, war der Gehalt an PSTVd-(+)RNA sehr hoch, der Gehalt an komplementärer (-)RNA war jedoch im Vergleich zu den frisch infizierten Protoplasten stark gesunken.

5.4.2 Auftrennung der Nukleinsäuren aus Protoplasten durch Gelelektrophorese

Proben des frühen Infektionsverlaufs mit PSTVd wurden aus Protoplasten gewonnen, durch Glyoxal denaturiert und der Zeitreihe entsprechend nebeneinander aufgetragen. Durch Gelelektrophorese in 5% Natrium-Phosphatgelen erfolgte eine Auftrennung nach der Molekülgröße. Die PSTVd-(+)- und (-)RNAs wurden durch strangspezifische Northern Hybridisierung nachgewiesen.

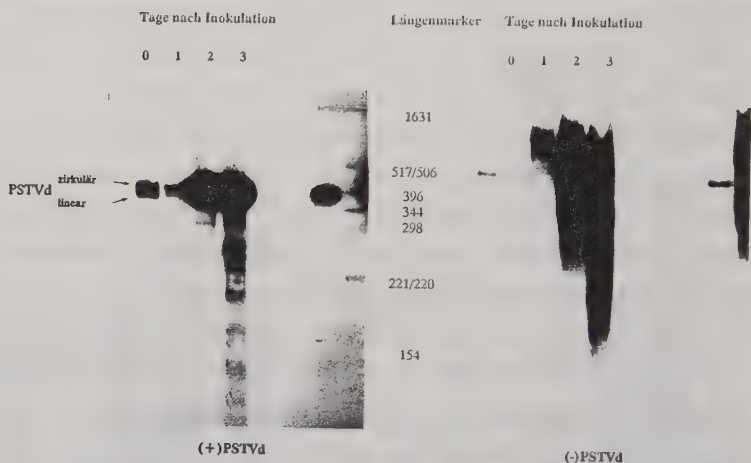


Abb. 5: Nachweis von gelektrophoretisch aufgetrennter, neusynthetisierter PSTVD-RNA durch strangspezifische Northern Hybridisierung.

Die extrahierten, durch Glyoxal denaturierten Nukleinsäuren von jeweils 5×10^5 Protoplasten wurden zweimal entsprechend der Zeitreihe nebeneinander in einem 5%-Na-Phosphat-Gel aufgetrennt. Als Längenmarker dienen die [^{32}P]-markierten Hinf-Fragmente von pBR322, die Zahlenangaben entsprechen der Anzahl der Nukleotide pro Strang des Fragments. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden auf eine Nitrocellulosemembran überführt und durch Northern-Hybridisierung die PSTVd(+)- und PSTVd(-)-RNA nachgewiesen. Die Exposition des Röntgenfilms dauerte drei Tage bei -80°C mit Quanta III als Verstärkerfolie.

Das Inokulum, die PSTVd(+)-RNA nimmt am ersten Tag nach Inokulation stark ab, besonders stark betroffen davon ist die lineare monomere Form der PSTVd-RNA. In den beiden folgenden Tagen nimmt der Gehalt an PSTVd-RNA sehr stark zu. PSTVd(-)-RNA ist dagegen schon nach 24 Stunden in großem Umfang nachweisbar. Diese neusynthetisierte RNA besitzt bereits 1,5- bis 4fache Viroideinheitslänge. Ihr Gehalt steigt an den folgenden Tagen weiterhin sehr stark an.

Wie Abb. 5 zeigt, besitzen die komplementären (-)RNAs bereits nach 24 Stunden mehrfache Viroidlänge. Die bereits im Dot-Blot beobachtete Abnahme der PSTVd-(+)RNA wirkt sich hauptsächlich auf die linearen, monomeren Moleküle aus, sie werden bevorzugt abgebaut. Eine deutliche Zunahme von monomerer PSTVd-(+)RNA zeigt sich erst nach ca. 48 Stunden, gleichzeitig erhöht sich der Gehalt der PSTVd-komplementären RNA. Der Anstieg der Viroid-RNA beider Polarität hält auch nach 72 Stunden an, die Viroidreplikation läuft "auf vollen Touren".

5.4.3 Zellkulturen mit permanenter PSTVd-Infektion

5.4.3.1 Bestimmung des PSTVd-Gehalts in den einzelnen Zelllinien

Die regenerierten Zellen der unterschiedlichen Inokulationsansätze wurden als getrennte Suspensionskulturen weiterkultiviert, die Inokulationsmenge wurde als Bezeichnung weitergeführt.

Nach einem Jahr permanenter Kultur (ca. 48 Verdünnungspassagen) wurden Zellen aus den unterschiedlichen Schüttelkulturen entnommen und auf ihren Gehalt an PSTVd-RNA untersucht. Die extrahierten Nukleinsäuren wurden in Äquivalenten des gepackten Zellvolumens in Wasser gelöst und in einer Verdünnungsreihe mit Dot-Blot-Hybridisierung untersucht. Im Vergleich dazu wurden Aliquots der Suspensionskulturen, die 70 Tage nach Inokulation extrahiert worden waren, durch Dot-Blot-Hybridisierung analysiert. Der Gehalt an PSTVd-(+)RNA nach einem Jahr Kultur war identisch mit dem Gehalt direkt nach der Regeneration (Abb. 6).

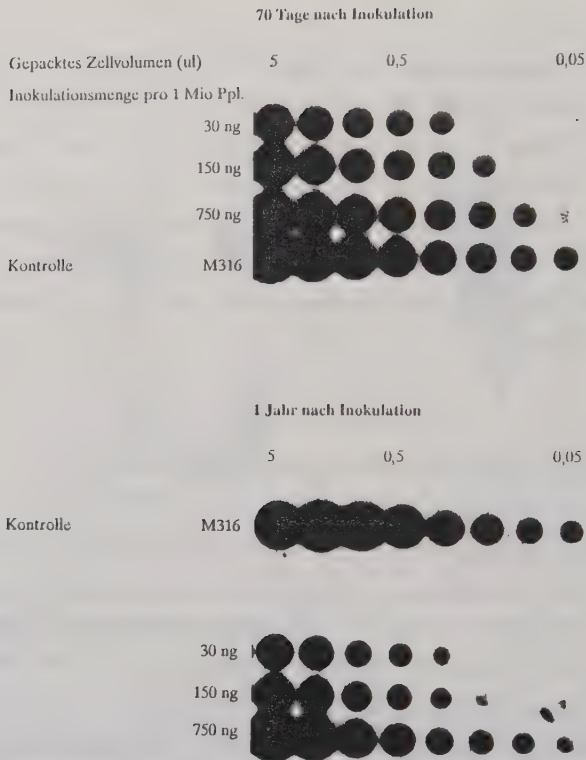


Abb. 6: Bestimmung der relativen PSTVd-Mengen in Zellsuspensionskulturen, die aus inokulierten Protoplasten regeneriert wurden.

Ein Aliquot der regenerierten Zellen aus den verschiedenen Inokulationsansätzen wurde 70 Tage nach Inokulation entnommen, die Nukleinsäure extrahiert und durch Dot-Blot-Hybridisierung auf den Gehalt an PSTVd(+)-RNA pro gepacktes Zellvolumen untersucht (oberer Teil der Abbildung). Das gleiche Experiment wurde nach einem Jahr permanenter Weiterkultivierung der Zelllinien erneut durchgeführt. Die Proben wurden auf gleiche Weise denaturiert, verdünnt, aufgetragen und auf den Gehalt an PSTVd(+)-RNA untersucht (unterer Teil der Abbildung). Der PSTVd-Gehalt der permanent infizierten Zelllinie M316 diente jeweils als Standard zur Kontrolle der Signalstärke in der Autoradiographie.

5.4.3.2 Wachstumscharakteristika der einzelnen Zelllinien

Zum gleichen Zeitpunkt wurden zur Charakterisierung der Wachstumseigenschaften der unterschiedlichen Zelllinien die Zunahme des gepackten Zellvolumens und der mitotische Index nach Verdünnung mit Kulturmedium untersucht. Wie in Abbildung 7 gezeigt werden kann, ergab sich kein auffälliger Einfluß des unterschiedlichen Viroidgehalts in den einzelnen Kulturlinien auf die Wachstumscharakteristika.

Die Viroid-RNA scheint in den entstandenen, permanent infizierten Zellkulturen nur durch Zellteilung auf die Nachkommenschaft weitergegeben zu werden, eine "horizontale" Weiterinfektion innerhalb der Kultur findet nicht statt; zudem besitzen weder die infizierten noch die nichtinfizierten Zellen unter den Kulturbedingungen Selektionsvorteile, keine der beiden Zelltypen wird aus der Schüttelkultur verdrängt.

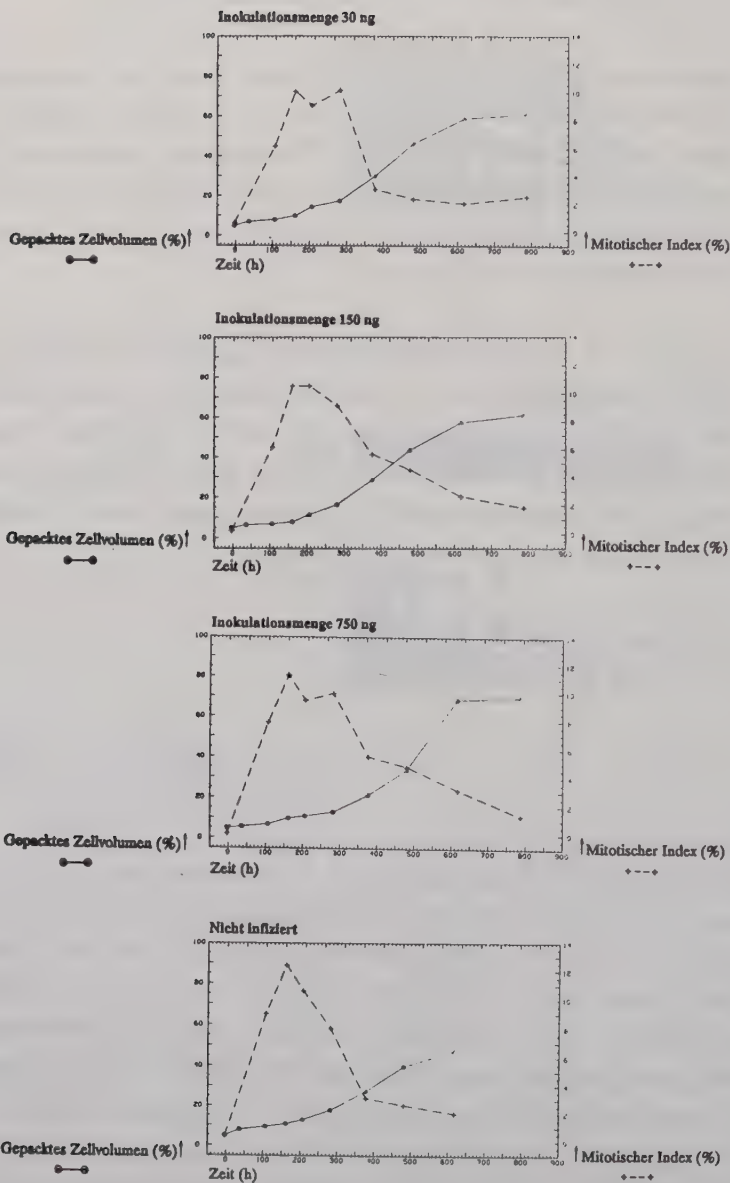


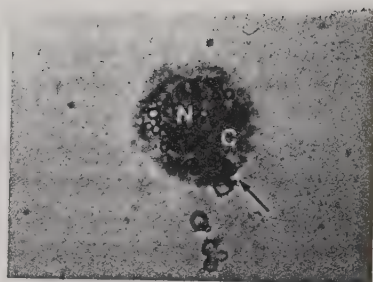
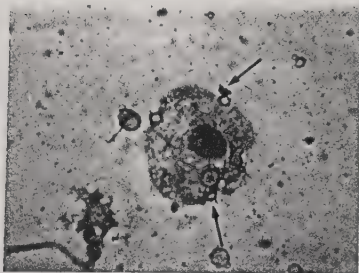
Abb. 7: Einfluß der Viroidmenge auf Wachstumscharakteristika der Suspensionskulturen.

Abb. 7:

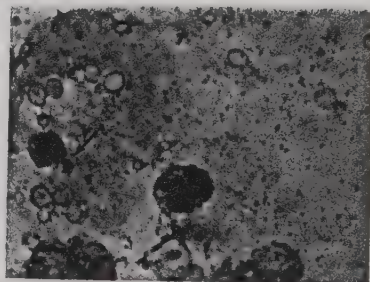
Die Untersuchungen wurden mit Suspensionszellen, die sich in einer späten Wachstumsphase befanden, durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zugabe von frischem Kulturmedium auf ein gepacktes Zellvolumen von 5 Prozent verdünnt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen. Das gepackte Zellvolumen als Maß für die Zellvermehrung, sowie der mitotische Index als Maß für die Teilungsaktivität wurden für die vier unabhängigen Zelllinien erstellt. Beide Werte wurden für die individuellen Zelllinien entsprechend der Zeitwerte in eine Graphik übereinander gezeichnet.

Der Vergleich der vier erhaltenen Graphiken zeigt, daß die Anwesenheit von PSTVd-RNA in den Zellen keinen offensichtlichen Einfluß auf die Teilungsaktivität (gestrichelte Linie) und das Zellenwachstum (durchgezogene Linie) besitzt. Ob das geringere gepackte Zellvolumen der nicht-infizierten Zelllinie am Ende der Wachstumskurve auf kleinere Zellvolumina oder geringere Zellenanzahl zurückzuführen ist, konnte durch diesen Versuchsansatz nicht untersucht werden.

Direkt nach Inokulation



6 Stunden nach Inokulation



24 Stunden nach Inokulation

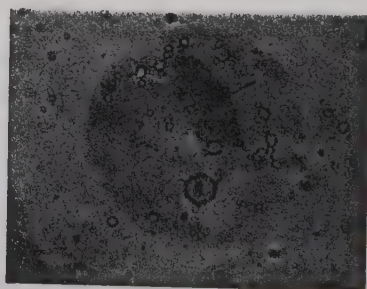
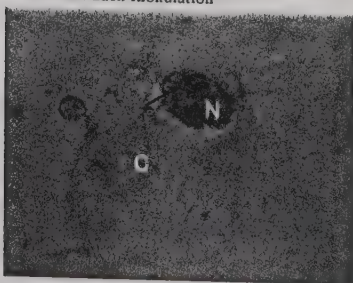


Abb. 8: Mikroautoradiographie von inokulierten Protoplasten.

Abb. 8:

Aliquots von regenerierenden Protoplasten wurden direkt, 6 Stunden und 24 Stunden nach Inokulation in 45% Essigsäure denaturiert und fixiert, danach auf Objektträger getropft und mit einer lichtempfindlichen Photoemulsion überschichtet. Die Objektträger wurden 36 bis 48 h bei 4°C exponiert, die Photoemulsion zuerst entwickelt und danach die Zellen mit Giemsa angefärbt. Zur Betrachtung der Zellen wurde Immersionsöl verwendet und bei 500x Vergrößerung mikroskopiert. Die Giemsa-Färbung führt zu hell gefärbtem Cytoplasma (C, in weißer Schrift) und dunkel gefärbten Zellkernen (N, in Weiß), bei den bläschenartigen Strukturen in einigen Präparationen handelt es sich um Stärkekörnchen. Starke Anhäufungen der Silberkörnchen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Direkt nach der Inokulation befindet sich die Viroid-RNA an der Zellperipherie, sie verteilt sich nach 6 Stunden in der Zelle, es sind allerdings auch schon Anhäufungen am Zellkern zu erkennen, nach vierundzwanzig Stunden tritt die markierte Viroid-RNA konzentriert im Zellkern auf.

5.4.4 Transport von Viroid-RNA in den Zellkern

Wie die vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, war nach 24 Stunden der Beginn der Viroidreplikation durch die Neusynthese von viroidkomplementärer RNA in frisch inokulierten Protoplasten nachweisbar. In dieser Zeit muß die PSTVd-RNA von der Peripherie der Zelle in den Zellkern gelangt und von der RNA-Polymerase transkribiert worden sein. Das Vordringen der Viroid-RNA zum Ort der Replikation wurde durch Mikroautoradiographie verfolgt. SP6-RNAs, in präparativen Mengen hergestellt und durch Zugabe von [^{32}P]-UTP radioaktiv markiert, wurden in Liposomen verpackt und mit Protoplasten fusioniert. Direkt nach der Inokulation (0 h) bzw. 6 und 24 Stunden später wurden Protoplasten entnommen, fixiert und auf vorbereitete Objektträger getropft, mit einer lichtempfindlichen Emulsion beschichtet und autoradiographiert. Abbildung 8 auf der vorherigen Seite zeigt mikroskopische Aufnahmen von mit Giemsa gefärbten Protoplasten. Die Viroid-RNA ist durch die schwarzen Silberkörnchen in der Photoemulsion sichtbar. Man erkennt deutlich, daß die Viroid-RNA nach 24 Stunden im Zellkern konzentriert ist.

5.5 Analyse der Replikationsintermediären aus Protoplasten, die mit PSTVd-RNA inokuliert wurden

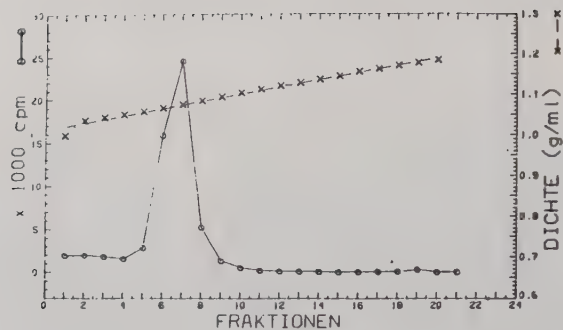
Die während der Replikation auftretenden PSTVd-RNA-Stränge können zum einen in unterschiedlichen Gelsystemen durch Elektrophorese aufgetrennt werden. Mit einer anderen Methode, der "Flüssig-Flüssig-Verteilungs-Chromatographie", einem wässrigen Zweiphasen-System mit PEG/Dextran (71), ließen sich große Mengen zellulärer Nukleinsäuren, sowie die darin enthaltene Viroid-RNA der permanent infizierten Zelllinie M316 zusätzlich auftrennen. Geringe Mengen von Nukleinsäuren und Viroid-RNAs, wie sie in frisch infizierten Protoplasten in der frühen Phase der Viroidreplikation entstehen, konnten mit diesem System jedoch nicht aufgetrennt werden. Sie konnten jedoch in einem Saccharosedichtegradienten weiter aufgereinigt werden. Benutzt wurde ein geformter linearer Gradient von 5% bis 40% Saccharose, es wurde mit

41.000 Upm, 14 Stunden lang bei 5°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugenlauf wurde der Gradient in 15 bis 20 Fraktionen aufgeteilt.

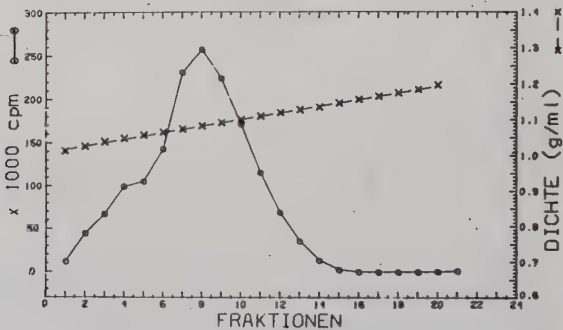
5.5.1 Auftrennung von PSTVd-RNA im Saccharosedichtegradienten

Die Auftrennung von monomerer, zirkulärer PSTVd-RNA im Gradienten wurde mit ^{125}I -markiertem PSTVd untersucht, zur Auftrennung von linearen, oligomeren Formen des PSTVd, wie sie im Verlauf der Replikation auftreten, wurde ^{32}p -markierte SP6-RNA mit 6,6facher Länge auf den Gradienten gegeben. Nach Beendigung des Zentrifugenlaufs und Fraktionierung des Gradienten wurden die erhaltenen Fraktionen durch Szintillationsmessung auf ihren Gehalt an radioaktivmarkierter PSTVd-RNA untersucht. Die gesamte monomere PSTVd-RNA bleibt im oberen Teil des Gradienten, ihr Hauptpeak befindet sich zwischen Fraktion 6 und 8. Die SP6-Transkripte wandern tiefer in den Gradienten hinein, sie verteilen sich auf die Fraktionen 9-14. Ob das Auftrennverhalten der monomeren, zirkulären PSTVd-RNA durch zelluläre RNA beeinflusst wird, zeigte die Analyse von einzelnen Fraktionen einer weiteren Dichtegradientenzentrifugation. Die Nukleinsäure aus nicht infizierten Zellkulturen wurde mit PSTVd-RNA gemischt und durch Zentrifugation aufgetrennt. Die Northern-Hybridisierung, die das (+)PSTVd spezifisch nachweist, ergab das gleiche Bild, wie es bei der Auftrennung der isolierten PSTVd-RNA erhalten wurde. Diese Ergebnisse sind gemeinsam in Abbildung 9 dargestellt.

A)

¹²⁵I-PSTVd

B)

³²P-SP6-Transkript

C)

Fraktion

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Längenmarker |

517/506 -

396 -

344 -

220/221 -

PSTVd-RNA
gemischt mit RNA aus
nichtinfizierten Zellen

Abb. 9: Zonen-zentrifugation von PSTVd-RNA-Spezies definierter Längen in einem Saccharosedichte-gradienten.

Abb. 9:

Mit [^{125}I] radioaktiv markierte, monomere PSTVd-RNA (A)) und in vitro hergestellte [^{32}P]-markierte SP6-PSTVd-RNA mit 6,6facher Einheitslänge (B)) wurden auf einen Saccharosedichtegradienten (5-40%) aufgetragen und zentrifugiert (41.000 Upm, 14 h, 5°C). Der Gradient wurde in Fraktionen von ca. 500 μl aufgeteilt und in den einzelnen Fraktionen die Radioaktivität im Szintillationszähler und die Dichte im Refraktometer bestimmt. Die graphische Darstellung zeigt die Verteilung der Radioaktivität in den Fraktionen in Zerfällen pro Minute ($\times 1000$ cpm) durch Kreise, mit einer durchgezogenen Linie verbunden und die Dichte des Gradienten mit X und gestrichelter Linie. Ob das Verteilungsmuster der monomeren PSTVd-RNA durch zelluläre Nukleinsäure beeinflusst wird, ist in (C)) untersucht. Dazu wurde aufgereinigte monomere PSTVd-RNA mit zellulärer RNA aus nichtinfizierten Zellen gemischt und auf die beschriebene Art und Weise zentrifugiert und fraktioniert. Die Nukleinsäure der einzelnen Fraktionen wurde denaturiert, nebeneinander in aufsteigender Reihenfolge aufgetragen, durch Gelelektrophorese in 5% Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die PSTVd-RNA durch Northern Hybridisierung mit (+)PSTVd-spezifischer SP6-RNA nachgewiesen. Die Auftrennung der monomeren ^{125}I -PSTVd-RNA ergibt eine Konzentration in den Fraktionen 6 bis 8, die SP6-PSTVd-RNA wandert in die Fraktionen 9 bis 14, eine Interaktion von monomerer PSTVd-RNA mit zellulären Nukleinsäuren, die anhand einer Verschiebung im Gradienten erkennbar sein sollte, kann nicht nachgewiesen werden, sie befindet sich in Fraktion 4 bis 7.

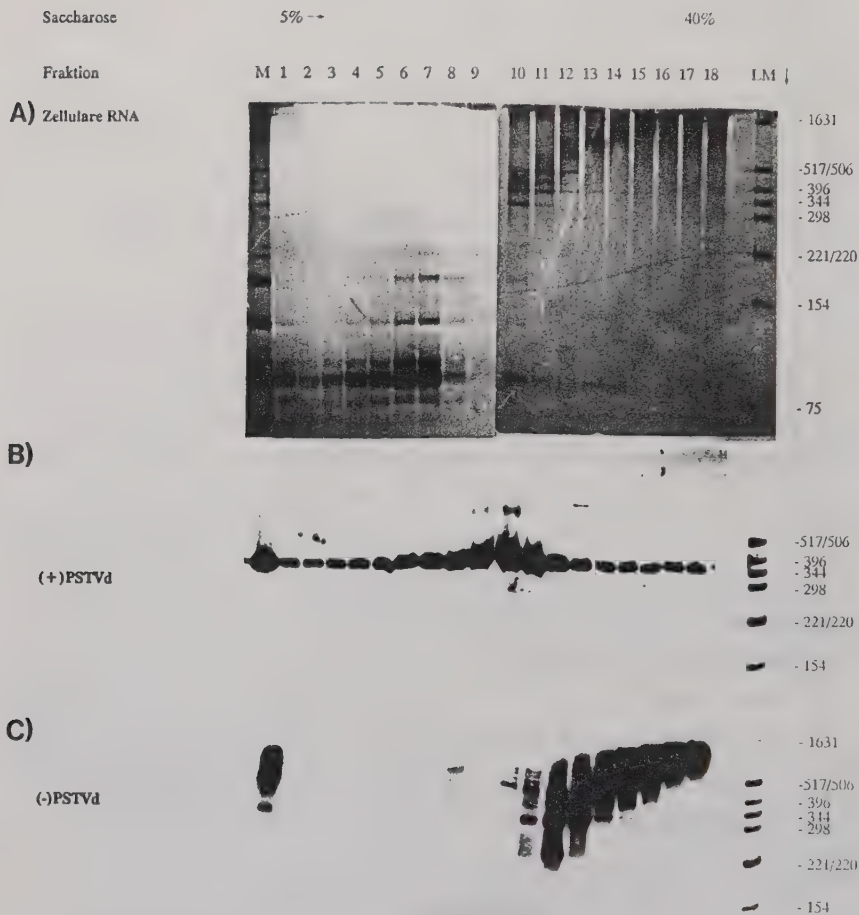


Abb. 10: Zonenzentrifugation von RNA, die aus PSTVd-infizierten Zellen extrahiert wurde, in einem Saccharosedichtegradienten.

Abb. 10:

100 µg zelluläre Nukleinsäure, die aus der Zelllinie M316 isoliert worden war, wurde über einen Saccharosedichtegradienten (5-40%) aufgetrennt (41.000 Upm, 14 h, 5°C). Die Auftrennung erfolgte unter Bedingungen, die RNA-RNA-Doppelbindungen nicht zerstört. Der Gradient wurde in ca. 20 Fraktionen aufgeteilt und die Nukleinsäure zurückgewonnen. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrer Lage im Gradienten in die Taschen eines 5% Polyacrylamidgels aufgetrennt, nachdem die Nukleinsäuren durch Glyoxal denaturiert worden waren. An den Seiten wurden als Marker die zelluläre Nukleinsäure (M) und als Längenmarker die Hinf-Fragmente von pBR322 aufgetrennt (LM). Die DNA-Fragmente sind entsprechend der Anzahl ihrer Nukleotide pro Strang bezeichnet. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäure erfolgte in drei parallelen "Gelläufen". Die zelluläre RNA wurde direkt im Gel mit Silberfärbung nachgewiesen (A)). Die Nukleinsäure der anderen Gele wurde auf Nitrocellulosemembranen überführt und die (+)- und (-)-PSTVd-RNA durch strangspezifische Northern Hybridisierung mit SP6-RNA-Sonden nachgewiesen. Die Autoradiographie erfolgte für (+)PSTVd (B)) über drei Tage und für (-)PSTVd (C)) über fünf Tage bei -80°C mit Verstärkerfolie "Lightning Plus".

Im Gegensatz zu den mit freier PSTVd-RNA erhaltenen Befunden (vgl. Abb. 9) befindet sich in allen Fraktionen des Gradienten die monomere (+)PSTVd-RNA, sie tritt allerdings in den Fraktionen 6-12 gehäuft auf. Die in ihrer Länge heterogene (-)PSTVd-RNA befindet sich in den "tiefen" Fraktionen mit hohem Saccharosegehalt und ist ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Oligomere Formen von (+)PSTVd sind nur in geringem Maß im mittleren Teil des Gradienten vorhanden (Fraktionen 9 -14) und werden nicht in den tiefsten Bereichen des Gradienten nachgewiesen.

5.5.2 Auftrennung von Nukleinsäuren aus permanent PSTVd-infizierten Zellen

Die Auftrennung von Nukleinsäuren aus Zellen mit permanenter Viroidinfektion wurde als nächstes untersucht und wies das in Abb. 10 gezeigte Muster auf. In den Fraktionen 3-7 im oberen Teil des Gradienten befinden sich die kleinen RNAs von 4 S - 5,8 S, im mittleren Bereich, den Fraktionen 10-12, die 7 S-RNA und einige bisher nicht charakterisierte RNAs, und im unteren Teil mit dem hohen Saccharosegehalt sind fast ausschließlich hochmolekulare ribosomale RNAs konzentriert.

Die Hauptmenge der monomeren PSTVd-(+)RNA befindet sich in den Fraktionen 6-12, also dem Bereich des Gradienten, in den auch die radioaktiv markierte monomere PSTVd-RNA wanderte. In den Fraktionen 9-14 sind zusätzlich höhermolekulare RNAs mit PSTVd-(+)Sequenz, sie ergeben die gleiche Verteilung wie zuvor die oligomeren SP6-Transkripte. Im tieferen Bereich des Gradienten (Fraktionen 15-18) sind diese Formen der PSTVd-(+)RNA nicht mehr anzutreffen, PSTVd in Einheitslänge ist jedoch weiter in den tiefen Schichten des Gradienten mit hoher Saccharosekonzentration nachweisbar. Die heterogene RNA-Population der PSTVd-(-)RNA mit 0,5- bis 6facher PSTVd-Einheitslänge wird ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Die kurzen (-)RNAs befinden sich im mittleren Teil des Gradienten (Fraktion 11), wo sie gemäß ihrer Molekülgröße nicht auftreten sollten. Die SP6-Transkripte mit 6,6facher Viroidlänge sind in den vorherigen Untersuchungen nur bis Fraktion 14 vorgeedrungen, die hochmolekularen Formen aus infizierten Zellen sind jedoch bis in Fraktion 18 nachzuweisen. Da in diesen Fraktionen, wie erwähnt, immer die monomere PSTVd-(+)RNA vorhanden ist, könnte das verschobene Verteilungsmuster der langen (-)PSTVd-RNA dadurch erklärt werden, daß beide Viroidpolaritäten in RNA-RNA-Doppelsträngen aneinanderhängen und so durch ihr gemeinsames höheres Gewicht tiefer in den Gradienten vordringen, als es ihrer jeweiligen Moleküllänge entspricht.

5.5.3 Auftrennung von RNA aus Protoplasten nach Infektion mit PSTVd-RNA

Wie bisher gezeigt wurde, konnten über das System der Gradientenzentrifugation kleine Mengen Viroid- und viroidkomplementäre RNA entsprechend ihrer Größe aufgereinigt werden. Mit diesem Trennsystem konnten auch die Nukleinsäuren, die 1, 2 und 3 Tage nach Inokulation aus Protoplasten extrahiert worden waren, unter den gleichen Bedingungen aufgetrennt werden. Die Abbildungen 11 A bis 11 C zeigen die Ergebnisse der Auftrennung von PSTVd-(+)- und -(-)RNA, die durch die Zentrifugation unter "nativen" Bedingungen mit einer nachfolgenden elektrophoretischen Auftrennung der Fraktionen unter denaturierenden Bedingungen und strangspezifischer Northern Hybridisierung erzielt wurden.

1 Tag nach Inokulation

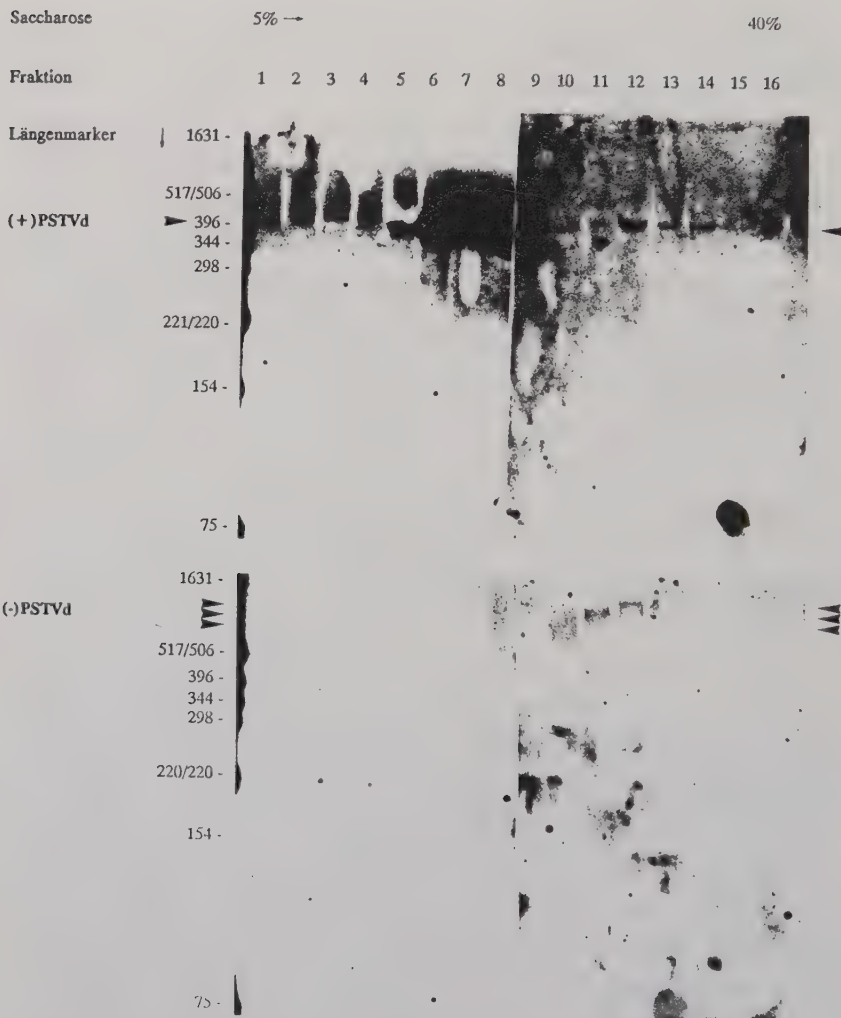


Abb. 11 A: Zonenzentrifugation von Protoplasten-RNA 1 Tag nach Inokulation mit PSTVd.

Abb. 11 A:

Ein Tag nach Inokulation mit PSTVd-RNA wurde die Nukleinsäure von 1 Million Protoplasten extrahiert und in einem 5-40% Saccharosedichtegradienten unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Nukleinsäure der einzelnen Fraktionen, durch Glyoxal denaturiert, wurde parallel in zwei Gelelektrophoreseansätzen aufgetrennt. Die Proben wurden ihrer Lage im Gradienten entsprechend, nebeneinander in 5% Polyacrylamidgelen aufgetragen. Eine Fraktionenreihe wurde nach Transfer auf Nitrocellulosemembran durch PSTVd(+)-spezifische, die zweite Reihe durch (-)-spezifische Northern Hybridisierung analysiert. Die Autoradiogramme sind untereinander, entsprechend ihrer Fraktionsnummer angeordnet. Die Autoradiographie wurde 4 Wochen bei -80°C mit Quanta III-Verstärkerfolien durchgeführt. Die lange Exposition führte zu einer starken Schwärzung des Längenmarkers (Hinf-Fragmente des Plasmids pBR322, die Zahlen bedeuten Anzahl der Nukleotide) und zur Überexponierung der (+)PSTVd-RNA in den Fraktionen 6-8 sowie zu einer starken "Hintergrundschwärzung". Dennoch sind schwache Signale von (+)- und (-)-PSTVd in anderen Fraktionen deutlich erkennbar.

Die monomere PSTVd-RNA (durch eine Pfeilspitze wird ihre Lage verdeutlicht) befindet sich zum Hauptanteil in den Fraktionen 6 und 7, dem Bereich der freien, monomeren Viroid-RNA. Geringe Mengen von monomerem Viroid sind jedoch auch im tiefen Gradientenbereich, mit hohem Saccharosegehalt, in den Fraktionen 12-14 nachweisbar. Die im unteren Teil gezeigte (-)-spezifische Hybridisierung der gleichen Auftrennung weist in diesen "tiefen" Gradientenschichten eine heterogene Population der komplementären oligomeren (-)-PSTVd-RNA nach (durch drei Pfeilspitzen verdeutlicht). Da diese komplementären Viroid-RNAs, sie besitzen die 3- bis 6fache PSTVd-Einheitslänge, nicht im Inokulum vorhanden sind (vgl. Abb. 4 und 5) müssen sie innerhalb der ersten 24 Stunden neu entstanden sein und hängen vermutlich mit dem monomeren PSTVd, ihrem "Template" zusammen und können somit nascierende Replikationsintermediäre darstellen.

2 Tage nach Inokulation

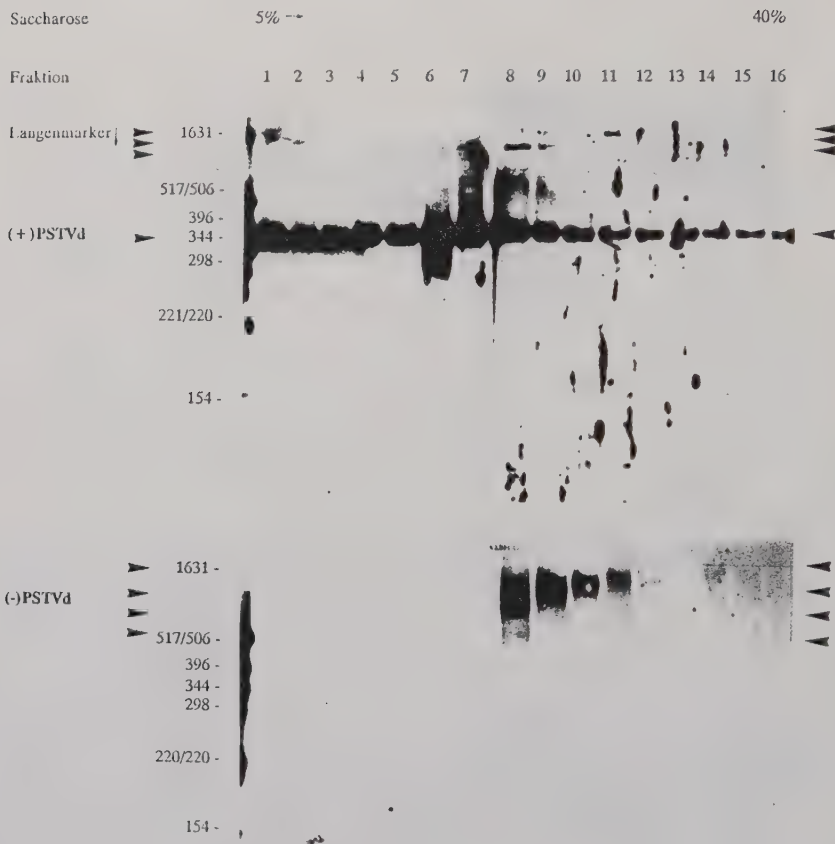


Abb. 11 B: Zonenzentrifugation von Protoplasten-RNA 2 Tage nach Inokulation mit PSTVd.

Abb. 11 B:

Aus einer Million Protoplasten wurde 2 Tage nach Inokulation die Nukleinsäure extrahiert und durch Zonzentrifugation in einem Saccharosedichtegradienten unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Die denaturierten Nukleinsäuren der gesammelten Fraktionen wurden wie zuvor, auf zwei Ansätze verteilt, nebeneinander aufgetragen. Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten parallelen Ansätze wurden mittels molekularer Hybridisierung auf (+)- und (-)PSTVd-RNA untersucht. Die Autoradiographie bei -80°C mit Quanta III als Verstärkerfolie erfolgte für 2 Wochen.

Der Gehalt an monomerer Viroid-RNA (einzelne Pfeilspitze) im Bereich der freien (Fraktion 5-7), wie der komplexierten Formen nimmt insgesamt stark zu. Jetzt werden auch höhermolekulare Formen mit (+)-Polarität in den Gradientenbereichen mit höherem Saccharosegehalt (Fraktionen 7-15) nachweisbar. (Dieser Bereich wird mit drei Pfeilspitzen verdeutlicht). Auch der Gehalt der komplementären PSTVd-(-)RNA in den tiefen Gradientenfraktionen nimmt zu (siehe die vier Pfeilspitzen im unteren Teil der Abbildung).

3 Tage nach Inokulation

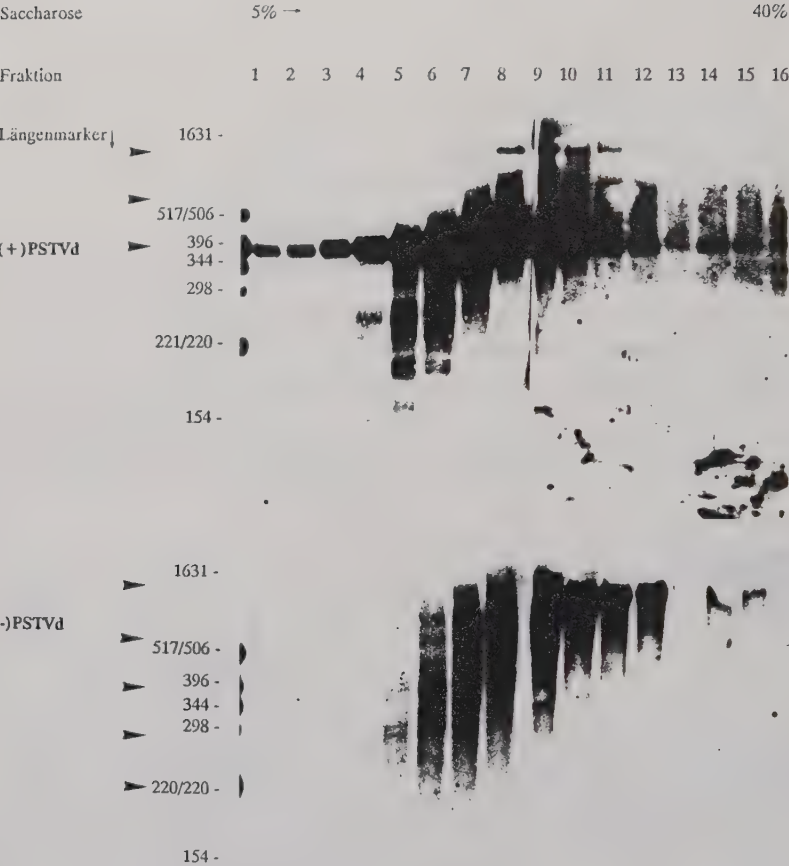


Abb. 11 C: Zonenzentrifugation von Protoplasten-RNA 3 Tage nach Inokulation mit PSTVd.

Abb. 11 C:

Drei Tage nach Inokulation wurde nochmals aus einer Million Protoplasten die Nukleinsäure isoliert und unter den bereits beschriebenen Bedingungen auf einen Saccharosegradienten aufgetragen, zentrifugiert, die Nukleinsäure der Fraktionen denaturiert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Northern Hybridisierung (+)- und (-)PSTVd nachgewiesen. Die Autoradiographie mußte nur noch 1 Woche bei -80°C und mit Verstärkerfolie Quanta III durchgeführt werden.

Die entsprechend ihrer Fraktionsnummer untereinander angebrachten Autoradiogramme zeigten ein ähnliches Bild, wie es aus permanent infizierten Zellen auch erhalten werden kann. Im Unterschied dazu (vgl. Abb. 10), treten in diesem Nachweis der unterschiedlichen PSTVd-Formen noch viele (+)PSTVd-Moleküle auf, die kürzer als Einheitslänge sind. Im hochmolekularen Bereich tritt eine von den anderen (+)Viroid-RNAs scharf abgrenzte Bande auf, sie enthält wahrscheinlich das dimere, zirkuläre Viroid, wie es beim Processing der Viroid-RNA entstehen kann (72). Die große Heterogenität bei (+)PSTVd kann auch bei den komplementären (-)PSTVd-Formen festgestellt werden. Auch hier sind viele kurze Fragmente nachweisbar, es tritt jedoch keine definierte Bande einer monomeren (-)PSTVd-RNA auf.

5.6 Untersuchung von PSTVd-RNA nach mehrjähriger Vermehrung in Zellkulturen von *Solanum demissum*

Die PSTVd-Nachkommenschaft aus zwei permanent infizierten Zelllinien, die über lange Zeit kultiviert worden waren, wurde extrahiert, auf Infektiosität auf Tomatenpflanzen getestet und ihre Sequenz bestimmt:

Zelllinie M316 ist über 8 Jahre auf künstlichen Nährböden kultiviert worden, sie entstammt Pflanzen der Wildkartoffel *Solanum demissum*, die zuvor systemisch mit PSTVd type strain infiziert worden waren. Der PSTVd type strain war von T.O. Diener 1971 (4) untersucht und als erstes Viroid von Gross und Mitarbeitern 1978 (9) sequenziert und molekular charakterisiert worden.

Die Zelllinie RK46 war durch Regeneration von Protoplasten zu Kalluszellen nach Infektion mit PSTVd type strain entstanden. Die Zellkultur war zum Zeitpunkt der Extraktion zwei Jahre lang kultiviert worden.

5.6.1 Analyse der Infektiosität von PSTVd-RNA aus den Zelllinien M316 und RK46

Beide Zelllinien wurden in Schüttelkulturflaschen vermehrt, die Gesamtnukleinsäure wurde nach Phenolextraktion der zellulären Proteine aus der wässrigen Phase gewonnen und durch 2 M LiCl-Fraktionierung weiter aufgereinigt. Der 2 M LiCl-lösliche Überstand (s-RNA), der den Großteil der Viroid-RNA enthielt, wurde in einem Biotest auf Infektiosität untersucht, dafür wurde die s-RNA in unterschiedlichen Konzentrationen in Puffer gelöst und auf junge Sämlinge von Buschtomaten der Kultursorte "Rentita" aufgetragen. In gleicher Weise wurden Kontrollpflanzen mit s-RNA, die das PSTVd type strain enthielt, behandelt (siehe Tabelle E). Bereits nach drei Wochen sind in 4 von 5 Kontrollpflanzen Erkrankungssymptome zu erkennen, ebenso in 7 von 15 Pflanzen, die mit s-RNA aus der Zellkultur RK46 infiziert wurden.

Tabelle E: Infektiositätstest der LiCl-löslichen RNA (s-RNA) aus den Zellkulturen M316 und RK46

Probe	Auftrags- menge in ug	Anzahl der Pflanzen mit viroid- spezifischen Symptomen nach			Infektionsrate
		3 W	4 W	8 W	
s-RNA M316	0,2	0	0	10	10/10
	2	0	2	10	10/10
	20	1	3	10	10/10
s-RNA RK46	0,2	2	5	5	5/5
	2	0	5	5	5/5
	20	5	5	5	5/5
s-RNA PSTVd type strain	20	4	5	5	5/5

Bei den mit s-RNA aus der Zellkultur M316 infizierten Pflanzen zeigen nach drei Wochen nur 1, nach vier Wochen nur 5 von 30 Pflanzen die PSTVd-typischen Krankheitssymptome. Zu diesem Zeitpunkt sind alle Kontrollpflanzen und alle mit s-RNA von RK46 inokulierten Pflanzen erkrankt. Nach 8 Wochen dagegen zeigt sich, daß alle inokulierten Pflanzen, die typische Krankheitssymptome besaßen.

Vier Wochen nach Inokulation wurde von jeder Pflanze ein kleines, sich neu entwickelndes Blättchen abgeschnitten, gewogen und die Gesamtnukleinsäure extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden in Äquivalenten des Blattgewichts verdünnt und in aufsteigender Verdünnung in einer Dot-Blot-Apparatur aufgetragen, der PSTVd-Gehalt wurde durch (+)-spezifische Hybridisierung ermittelt. Dieser Versuch wurde 8 Wochen nach Inokulation wiederholt und in gleicher Weise einer Dot-Blot-Hybridisierung mit (+)PSTVd-spezifischem Nachweis unterzogen (Abb. 12).

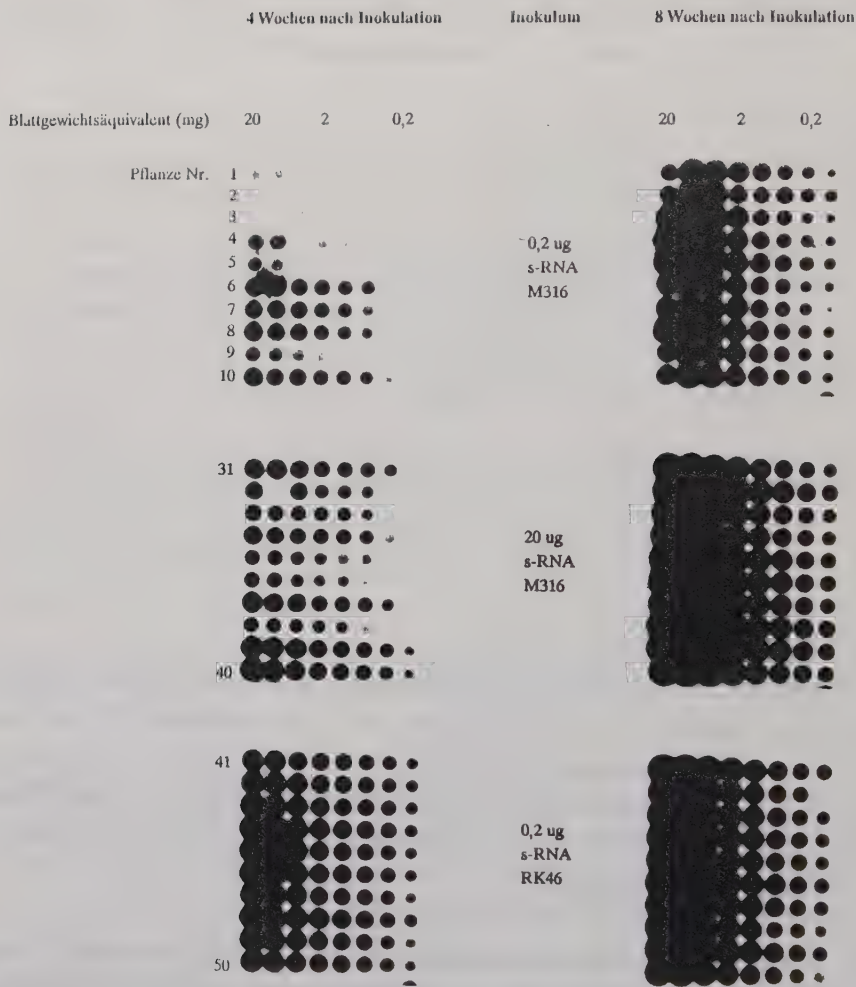


Abb. 12: PSTVd-Gehalt in Spitzenblättern von inokulierten Tomatenpflanzen.

Kleine sich entwickelnde Spitzenblätter aller inokulierten Pflanzen wurden 4 und 8 Wochen nach Inokulation abgenommen, gewogen und die Nukleinsäure extrahiert. Dem Naßgewicht entsprechend wurde die Nukleinsäure in H_2O bidest. gelöst und gleiche Mengen (20 mg Blattgewichtsäquivalent) mit Pufferlösung verdünnt, die Verdünnungsserie (Faktor 2,154) mit einer Dot-Blot-Apparatur aufgetragen und durch molekulare Hybridisierung auf Viroidgehalt untersucht. Die Autoradiographie der Nitrocellulosefilter erfolgte 24 h bei Raumtemperatur.

Pflanzen, die mit 0,2 μg s-RNA von M316 inokuliert wurden, weisen 4 Wochen nach Inokulation stark differierende Mengen an PSTVd-Nachkommenschaft in den Spitzenblättern auf (Nr. 1-10). Dies trifft auch auf Pflanzen zu (Nr. 31-40), die mit einem 100fach höheren Inokulum behandelt wurden. Mit s-RNA von RK46 inokulierte Pflanzen (Nr. 41-50) zeigen dagegen einen gleichmäßig hohen Viroidgehalt. Nach 8 Wochen hat sich dieses Bild gewandelt, der Gehalt in allen Pflanzen hat sich angeglichen, zu diesem Zeitpunkt zeigten auch alle Pflanzen die typischen Krankheitssymptome.

In allen mit viroidhaltiger s-RNA infizierten Pflanzen (außer Nr. 3) ist jedoch neusynthetisiertes PSTVd nachweisbar. Dies trifft auch für die mit s-RNA der Zelllinie M316 inokulierten Pflanzen zu, obwohl viele davon zu diesem Zeitpunkt keine Krankheitssymptome zeigten. Der Gehalt an Viroid-RNA pro Blattgewichtsäquivalent ist in den einzelnen Pflanzen dieser Versuchsgruppe unterschiedlich groß und im Vergleich zu den mit s-RNA von RK46 bzw. PSTVd type strain infizierten Pflanzen insgesamt geringer. Nach weiteren vier Wochen (8 W nach Inokulation) zeigten dann alle 30 Versuchspflanzen dieser Gruppe Krankheitssymptome, auch der Gehalt an PSTVd in den Spitzenblättern weist keine Konzentrationsunterschiede zu den Kontrollpflanzen mehr auf, wie die Ergebnisse der zweiten Dot-Blot-Hybridisierung zeigen. Die permanente Viroidreplikation über acht Jahre hinweg führte zu einer verlangsamen Symptomausprägung in Tomatenpflanzen. Die Sequenzierung der Viroid-RNA des Inokulums sollte klären, ob die Ursache dafür eine Sequenzveränderung der PSTVd-RNA im Inokulum war.

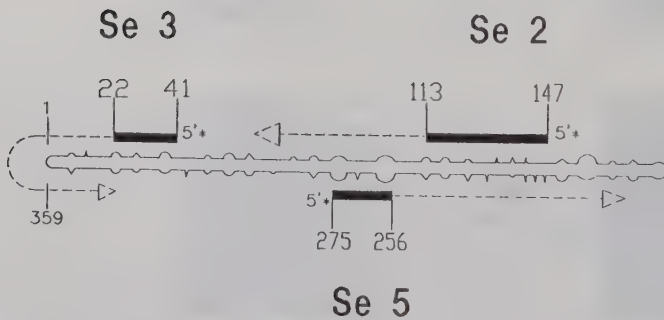


Abb. 13: Bindungsstellen der Sequenzprimer im PSTVd.

Schematische Darstellung der Sequenzierprimer mit der Lage ihrer Bindungsstelle im PSTVd-Molekül und ihre Bezeichnung. Die gestrichelte Linie mit Pfeil zeigt die Syntheserichtung der Reversen Transkription. Das 5' Ende der Primer ist radioaktiv markiert (). Diese drei Primer reichen aus, um die Nukleotidsequenz der PSTVd-RNA überlappend zu bestimmen.*

5.6.2 Sequenzierung der PSTVd-RNA aus Zellkulturen

Zur Sequenzbestimmung der aus den Zellkulturen M316 und RK46 stammenden Viroid-RNA wurden die bereits gewonnenen, 2 M LiCl-löslichen Nukleinsäuren weiter aufgereinigt. Über PSTVd-spezifische DNA-Primer wurde die Viroid-RNA mit Hilfe des Enzyms "Reverse Transkriptase" in cDNA überschrieben und deren Sequenz durch die basenspezifischen Spaltreaktionen nach Maxam und Gilbert bestimmt (Abb. 13 und 14).

In der PSTVd-Nachkommenschaft der Zelllinie RK46 war die Sequenz des PSTVd type strains nach zwei Jahren kontinuierlicher Vermehrung in der Zellkultur unverändert. In der Viroidnachkommenschaft der über acht Jahre alten Zelllinie M316 waren dagegen Veränderungen in der Nukleotidsequenz eingetreten: die Deletion eines Adenosins im "oligo-A-Bereich" zwischen Nukleotid 55 und 60 und drei Punktmutationen von G₆₄ zu A₆₄, von U₂₄₀ zu C₂₄₀ und von C₂₅₉ zu U₂₅₉. Da an keiner anderen Stelle im Viroidmolekül ein Nukleotid wieder eingesetzt worden war, bestand die PSTVd-RNA aus 358 statt aus 359 Nukleotiden. Diese Verkürzung war in keinem der bis dahin sequenzierten PSTVd-Isolate beobachtet worden, vielmehr hatten alle *in vitro* hergestellten Deletionsmutanten ihre biologische Aktivität, die Infektiosität für Tomatenpflanzen, völlig eingebüßt.

Faßt man die Ergebnisse der Sequenzierung mit den Befunden des Biotests zusammen, ergibt sich, daß die Veränderung der PSTVd-Sequenz durch permanente Vermehrung über acht Jahre in Zellkultur die Infektiosität der Mutante zwar nicht beeinflußt hatte, die Symptomausprägung in den Tomatenpflanzen war jedoch verlangsamt worden.

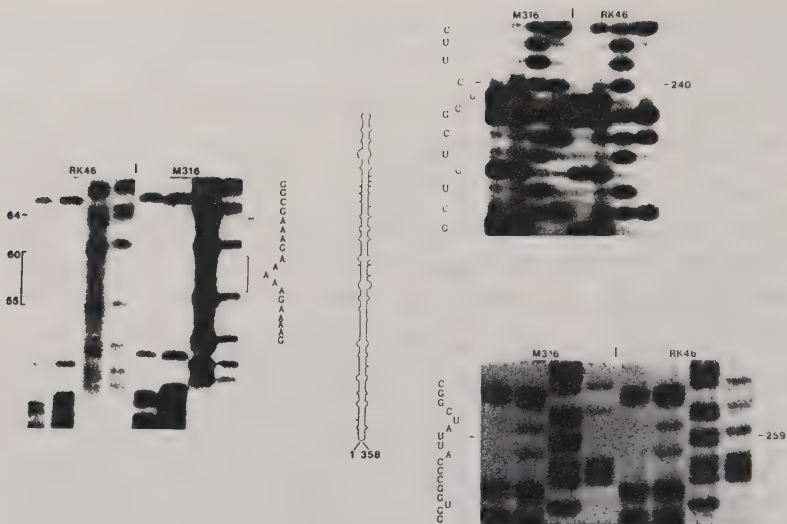


Abb. 14: Sequenzveränderungen im PSTVd nach 8 Jahren Replikation in Zellkultur.

Die PSTVd-RNA wurde im Unterschied zur gebräuchlichen Darstellung um 90° gedreht, der Übergang der Nukleotide 1 und 358 befindet sich dadurch nicht links, sondern unten. Die Bereiche mit einer Sequenzveränderung sind herausvergrößert und die einzelnen Nukleotide sind mit den Buchstaben der Basen und ihrer Position im Autoradiogramm entsprechend dargestellt. Die Sequenz der mutierten PSTVd-RNA, die aus der Zelllinie M316 isoliert wurde, ist wiedergegeben, die Sequenzveränderung ist durch einen Strich und die Position des Nukleotids angezeigt. Die Sequenz der Zelllinie RK46 entspricht der Sequenz des PSTVd type strain und dient als Referenz. Der Auftrag der Sequenzreaktionen auf der linken Seite entsprechen den DNA-Nukleotiden C; C+T; G+A; G, die Auftragfolge für die Reaktionen auf der rechten Seite lauten jeweils G; A+G; C+T; C. T in der Sequenzreaktion entspricht U in der RNA-Sequenz des PSTVd und kann direkt "übersetzt" und als RNA "gelesen" werden. Die Sequenzausschnitte zeigen die Mutationen: G₆₄ zu A₆₄; Deletion eines Adenosins im Bereich 60-55 (linke Seite); U₂₄₀ zu C₂₄₀ (rechte Seite oben); C₂₅₉ zu U₂₅₉ (rechte Seite unten).

5.6.3 Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft aus Tomatenpflanzen, die mit s-RNA aus Zellkulturen infiziert wurden

Die Bestimmung der Viroidsequenz der PSTVd-Nachkommenschaft in den infizierten Tomatenpflanzen könnte weiteren Aufschluß geben, was zur Verschiebung der Symptomausprägung geführt hat. Wenn die Sequenzänderung die Ursache war, müßte sich die Viroidsequenz der Zellkultur M316 erhalten haben, andererseits könnte in den Tomatenpflanzen im Laufe der Replikation eine erneut veränderte PSTVd-Sequenz entstanden sein, die sich möglicherweise verspätet in der Pflanze ausgebreiten konnte.

Fünf Pflanzen der mit s-RNA der Zelllinie M316 inokulierten Versuchsgruppe wurden so ausgewählt, daß sie zusätzlich Gruppen angehörten, die mit unterschiedlicher Menge s-RNA im Inokulum infiziert worden waren. Alle Pflanzen hatten nach acht Wochen die typischen Krankheitssymptome gezeigt, der Viroidgehalt in den Blättern war zum Zeitpunkt der Blattentnahme etwa gleich groß gewesen. Zusätzlich wurde eine mit der s-RNA der Zelllinie RK46 infizierte Pflanze ausgewählt, deren Viroid-RNA die unveränderte Sequenz des PSTVd type strain besaß. Die Sequenzierung erfolgte erneut mit den drei PSTVd-spezifischen DNA-Primern Se 2, Se 3 und Se 5 (vgl. Abb. 13).

In der PSTVd-Nachkommenschaft der mit s-RNA von M316 infizierten Pflanzen traten erneut Sequenzveränderungen auf. In allen Fällen wurde die Sequenz der PSTVd-RNA aus dem Inokulum verändert: die Deletion im "oligo-A-Bereich" wird restauriert, und zwar immer gemeinsam mit der Rückmutation des Nukleotids 64. In Pflanze 5 bleiben noch die Mutationen C₂₄₀ und U₂₅₉, in Pflanze 12 nur noch U₂₅₉ im unteren Teil der konservierten zentralen Region erhalten; in allen anderen Pflanzen ist die Nachkommenschaft zum PSTVd type strain revertiert. In der mit s-RNA von Zelllinie RK46 infizierten Pflanze 41 blieb die Sequenz der Nachkommenschaft damit identisch mit der des Inokulums.

Tabelle F: Sequenzveränderungen der PSTVd-RNA-Nachkommenschaft einzelner Tomatenpflanzen, die mit s-RNA der Zellkulturen M316 und RK46 infiziert wurden.

Probe	Auf- trags- menge in ug	Nr. der Ver- suchs- pflanze	Anzahl von Adenosin im Bereich	Mutationen bei Nukleotid				
			55-60	64	240	259		
PSTVd M316 *)			5	A	U	C		
s-RNA M316	0,2	2	5	A	C	U		
			6	G	C	U		
	0,2	5	6	G	U	C		
			2	12	6	G	C	C
			20	22	6	G	C	U
			29	6	G	C	U	
s-RNA RK46	20	41	6	G	C	U		
PSTVd type strain			6	G	C	U		

*) Die Nukleotide der PSTVd-RNA der Zelllinie M316 sind kursiv dargestellt, wenn sie auch in der PSTVd-Nachkommenschaft in den Pflanzen noch nachweisbar waren

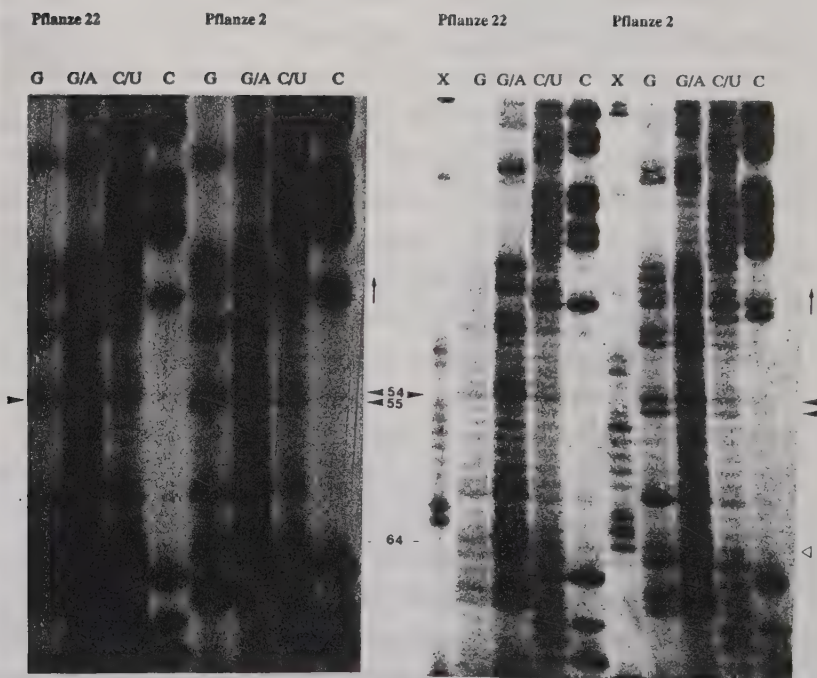
In Pflanze 2 war eine auffällige Sequenzveränderung zu beobachten. Die Rückmutation vom A₆₄ zum G₆₄ des type strain war zwar erfolgt, die Deletion eines Adenosins jedoch durch eine Insertion von Guanosin an der Position 55 rückgängig gemacht. Im darüberliegenden Gelbereich war eine eindeutige Bestimmung der Sequenz bei den Nukleotiden 53-40 durch das Auftreten von Schattenbanden unmöglich, was durch Fehler bei den Sequenzreaktionen verursacht worden sein konnte. Die Sequenzen in den gleichzeitig durchgeführten und parallel aufgetragenen Proben aus anderen Pflanzen waren jedoch deutlich zu bestimmen. Das mehrschichtige Bandenmuster konnte auch durch eine

Mischpopulation von unterschiedlichen PSTVd-Sequenzen hervorgerufen worden sein.

Die chemischen DNA-Spaltreaktionen zeichnen sich durch unterschiedliche Spezifitäten aus. Die Reaktion mit Hydrazin und Salz modifiziert nur Cytosin, Hydrazin allein führt bei beiden Pyrimidinen Thymin und Cytosin spezifisch zur Modifikation und zum Strangbruch. Nur wenn die Produkte beider Spaltreaktionen nebeneinander auf ein Sequenzgel aufgetragen werden, läßt sich Thymin von Cytosin durch das Fehlen der Bande in der Cytosin-spezifischen Spur unterscheiden. Befindet sich jedoch in einem DNA-Molekül an einer Stelle ein Cytosin und in einem anderen an gleicher Stelle ein Thymin, wird das T-Signal durch das C-Doppelsignal überlagert und läßt sich höchstens durch eine Signalverstärkung in der zweiten Bande identifizieren. Ob Thymin und Cytosin gleichzeitig vorhanden sind ist in Zweifelsfällen nur dann eindeutig zu erkennen, wenn nebenan eine zusätzliche T-spezifische Spaltreaktion aufgetragen wird. Dies gilt entsprechend für die spezifischen Spaltreaktionen bei den Purinen Adenin und Guanin.

Bei den PSTVd-Sequenzierungen wird die cDNA, also die der Viroid-RNA komplementäre DNA analysiert. Befindet sich an einer bestimmten Stelle im Viroid-Genom ein Adenin, muß die cDNA an dieser Stelle ein Thymin besitzen. Der Auftrag der Spaltprodukte auf das Sequenzgel kann so erfolgen, daß die vom Autoradiogramm abgelesene Sequenz der cDNA direkt in die Viroid-RNA-Sequenz übersetzt werden kann. Thymidinspuren werden als Adenosin gelesen, Cytosinbanden als Guanosin, Adenosinbanden entsprechen Uracil und Guanosinsignale Cytosin.

Um den undeutlichen Sequenzbereich in der PSTVd-Nachkommenschaft der Pflanze 2 genauer zu charakterisieren, wurden die vier Spaltreaktionen zusammen mit einer zusätzlichen, T-spezifischen Reaktion für die cDNA des Sequenzprimers Se 2 erneut durchgeführt und die Spaltprodukte für die "oligo-A-Region" aufgetrennt. Das Ergebnis beider Autoradiographien zeigt Abbildung 15.



X = zusätzliche T-spezifische Reaktion

Abb. 15: Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft in Tomatenpflanze Nr. 22 und 2.

Abb. 15:

Sequenzbestimmung der PSTVd-RNA in Pflanze Nr. 2 und Nr. 22. Die Proben der Sequenzreaktionen nach Maxam-Gilbert wurden in einem 5% Sequenzgel aufgetrennt. Das fixierte und getrocknete Gel wurde 36 bzw. 24 Stunden bei Raumtemperatur exponiert. Die Beschriftung der aufgetragenen Sequenzreaktionen entsprechen den Nukleotiden in der PSTVd-RNA. Die Vergleichssequenz aus Pflanze 22 besitzt die Sequenz des PSTVd type strain, die Position des Nukleotids 55 ist durch eine Pfeilspitze angedeutet.

In der Pflanze 2 entspricht die gelesene Sequenz im unteren Bereich des Sequenzgels der Sequenz des type strain, die Veränderung des Nukleotids 64 von G nach A, in der inokulierten Zellkulturmutante M316 vorhanden, konnte nicht mehr gefunden werden. Eine Sequenzveränderung war jedoch bei den Nukleotiden 54 und 55 eingetreten (zwei Pfeilköpfe). Ein zweites Guanosin war eingesetzt, damit wäre die Deletion eines Adenosins rückgängig gemacht worden. Im oberen Bereich war eine eindeutige Sequenzbestimmung durch Doppelbanden nicht möglich, dies wird durch einen nach oben gerichteten Pfeil angezeigt (↑). Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt eine erneute Auftrennung desselben Bereichs, es wurde zusätzlich die Spur der T-spezifischen Reaktion aufgetragen (X). Die Auftrennung zeigt das gleiche Bild wie zuvor, es ist aber deutlich zu erkennen, daß das G₆₄-Signal im unteren Bereich der Autoradiographie (durch ein offenes Dreieck angezeigt) ein ebenfalls vorhandenes A₆₄-Signal überdeckt. Das gleiche Phänomen tritt bei den Nukleotiden G₅₅ und G₅₄ auf (die Banden in der T-spezifischen Spur sind nur schwach zu sehen). Dieses Bild läßt sich dadurch erklären, daß sich zwei verschiedene PSTVd-RNAs gemeinsam in der Pflanze befinden. Durch die Deletion im Bereich von 60-55 in einer PSTVd-Population ist die "Sequenzleiter um eine Sproße zu kurz". Die Doppelbanden treten auf, da die Sequenzfolge durch die PSTVd-RNA-Population ohne Deletion an der "richtigen Stelle" nochmals auftritt.

Die zunächst beobachtete Mutation bei Nukleotid 55 erwies sich als Artefakt, das sich mit der zusätzlich durchgeführten T-spezifischen Reaktion erklären läßt. In Tomatenpflanze Nr. 2 waren gleichzeitig zwei PSTVd-Spezies vermehrt worden, sie unterscheiden sich im "oligo-A-Bereich" voneinander (siehe Darstellung unten). Dies kann an zwei Stellen deutlich gemacht werden: Bei Position 64 war unter dem Signal für Guanosin zusätzlich ein Signal für Adenosin. Dasselbe Phänomen konnte auch bei den Nukleotiden in Position 55 und 54 beobachtet werden. Eine PSTVd-RNA-Spezies besaß noch die Mutation in Position 64 (G zu A) und die benachbarte Deletion eines Adenosins zwischen den Nukleotiden 60 bis 55. Das gelesene Guanosin in Position 55 entstammt dem gleichen Molekül. Es entspricht der Sequenz der Mutante aus der Zellkultur M316 (Sequenz 1). Die zweite Spezies besaß dagegen die Sequenz des type strain (Sequenz 2). Das gelesene G₆₄-Signal stammt von ihr. In diesen Molekülen waren sechs Adenosinnukleotide im Bereich 60 bis 55, das daran anschließende Guanosin (Position 54) befindet sich um eine Position versetzt an der "richtigen" Stelle, es wird als zweites Guanosinsignal gelesen. Wie die T-spezifische Sequenzierung zeigt, liegen unter diesen beiden Guanosinsignalen zwei Adenosinsignale, sie stammen jeweils aus den beiden Viroidspezies. Die Sequenzdoppelbanden im oberen Gelbereich lassen sich auch durch diese beiden PSTVd-Spezies erklären, die gleichen Sequenzen treten durch die Deletion jeweils um ein Nukleotid verschoben nochmals auf, die Sequenz ist "außer Tritt".

Sich überschneidende Sequenzen in Pflanze 2:

Position:	64	60	5554	
Gelesene Sequenz:	GGCGGAAGAAAAAGGAAAGG			
Sequenz 1:	GGCGAAAGAAAAAGAAAAGA			
	(= M316)			
Sequenz 2:	GGCGGAAGAAAAAGAAAAG			
	(= type strain)			
Zusätzliche, T-spezifische Reaktion:	AAA AAAAAAAAAA			

Die weiteren Mutationen der Zellkulturmutante aus der Zelllinie M316, die sich im Sequenzbereich der Viroid-RNA befinden, der die untere Hälfte des Stäbchens bildet, waren in der PSTVd-Nachkommenschaft in Pflanze 2 nicht mehr zu erkennen.

Durch die lange Vermehrung in der Zellkultur war in der Zelllinie M316 eine veränderte, aber weiterhin infektiöse PSTVd-RNA entstanden. Sie war in den Tomatenpflanzen teilweise oder ganz zum PSTVd type strain revertiert. Die Insertion bzw. die Mutationen führten jedoch jeweils direkt zurück zur Sequenz des type strain, ein Einsetzen von anderen Nukleotiden wurde in keiner der analysierten Pflanzen beobachtet. In dieser Versuchsreihe fiel weiterhin auf, daß bei den hohen Konzentrationen an s-RNA im Inokulum (Pflanzen 22, 29) die Nachkommenschaft des PSTVd identisch mit der Sequenz des PSTVd type strain war.

Die Sequenzanalyse der Viroidnachkommenschaft aus einzelnen Pflanzen ließ keine Rückschlüsse zu, ob die Veränderungen durch Rückmutationen in den Pflanzen bzw. durch RNA-Rekombination der Deletionsmutante mit zellulären RNAs oder mit nicht deletierten Viroidmolekülen im Inokulum stattgefunden haben. Die direkte Sequenzierung der Viroid-RNA durch enzymatische Verlängerung der radioaktiv markierten DNA-Primer gibt jeweils die "Mastersequenz", die Sequenz der Viroidmoleküle wieder, die die Mehrheit in der Population repräsentieren. Viroidspezies, die in geringen Mengen vorliegen und einzelne Sequenzänderungen besitzen, ergeben auf dem Autoradiogramm keine oder nur schwache Signale, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen. Die type strain RNA könnte in Spuren in der Zellkultur erhalten geblieben sein und durch bessere Anpassung an die Vermehrung in Tomatenpflanzen herausselektioniert worden sein. Dafür spricht das Auftreten der PSTVd type strain Sequenz in den Pflanzen, die mit großen Mengen s-RNA (20 µg) infiziert worden sind; die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein Viroidmolekül mit der Sequenz des type strain im Inokulum befand, war 100mal größer wie bei den Pflanzen mit 0,2 µg s-RNA als Inokulum. Überraschenderweise war die Deletion und die Mutation im "oligo-A" Bereich in allen Fällen wieder zur type strain Sequenz revertiert. Doch auch die PSTVd-RNA, die diese Deletion/Mutation trägt, war in den Pflanzen vermehrungsfähig, wie die Sequenzanalyse der Viroidnachkommen in Pflanze 2 zeigte.

Um auch Moleküle zu erfassen, die nur in geringen Mengen in einer Viroidpopulation vorkommen, muß die PSTVd-RNA als revers transkribierte cDNA in geeignete bakterielle Plasmide kloniert, als einzelne rekombinante Klone vermehrt und deren Sequenz analysiert werden. Dazu ist eine größere Menge zirkulärer PSTVd-RNA nötig, sie ließ sich leicht aus Zellkulturen gewinnen, die Sequenzanalyse der PSTVd-DNA-Klone aus den Zellkulturen sollte weiterhin zeigen, ob die Viroid-RNA in der Zellkultur aus einer Mischung von mehreren PSTVd-Sequenzen bestand. Da die rekombinanten Klone jeweils nur eine definierte Viroidsequenz repräsentieren, ist es möglich, durch *in vitro* Transkription Viroid-RNA herzustellen, die aus einem definierten Inokulum besteht und dann erneut in Biotests eingesetzt werden kann, um genaue Auskunft über Infektiosität und Sequenzstabilität, bzw. Sequenzvariabilität zu erhalten.

5.7 Klonierung von PSTVd-RNA aus Zellkulturen nach mehrjähriger kontinuierlicher Vermehrung in Zellkulturen von *Solanum demissum*

Der Informationsgehalt der Viroid-RNA kann durch enzymatische Verlängerung von DNA-Primern in DNA "revers transkribiert" werden. Werden diese viroidkomplementären cDNA-Stränge zu Doppelsträngen aufgefüllt und mit den passenden Restriktionsenzymen zurechtgeschnitten, können die Restriktionsfragmente zur linearen Viroid-DNA in Einheitslänge oder aneinandergelinkte in mehrfacher Einheitslänge zusammengesetzt werden. Cress et al. (73) und Meshi et al. (74) zeigten, daß diese Viroid-DNA biologische Aktivität besitzt und Viroiderkrankungen in den Wirtspflanzen hervorruft, jedoch nur, wenn die Viroid-DNA in mehrfacher Einheitslänge vorliegt. M. Tabler und H. L. Sänger (75) wiesen darüber hinaus nach, daß auch einzelsträngige M13-DNA mit PSTVd-Sequenz ((+)Polarität) und PSTVd-komplementärer Sequenz ((-)Polarität) in Pflanzen Viroidinfektionen erzeugt. Viroid-DNA in Einheitslänge ist nur dann stark infektiös, wenn sie zuvor aus dem Plasmid herausgeschnitten wird. Wurden die zwei subgenomischen, nicht infektiösen AvaI-DNA-Fragmente gleichzeitig in die Blätter von Tomatenpflanzen gerieben, traten ebenfalls Viroiderkrankungen auf. Diese Ergebnisse lassen vermuten,

daß die Viroid-DNA in der Pflanze zuerst zu Molekülen mit mehrfacher Einheitslänge ligiert wird. Die von der PSTVd-DNA transkribierte PSTVd-RNA besitzt dann mehrfache Einheitslänge und könnte, wie die natürlich vorkommenden linearen Oligomeren, auf Einheitslänge geschnitten und zum infektiösen Zirkel verknüpft werden und in den "normalen" RNA-RNA-Replikationszyklus eintreten. Die inokulierte Viroid-DNA ist somit nicht das eigentlich infektiöse Agens, erst die Transkription in der Pflanze stellt aus der "Viroidmatrize" die infektiöse RNA her. Die dafür notwendigen Ligations- und Transkriptionsprozesse in der Pflanze können umgangen werden, indem von einem definierten DNA-Template mithilfe der SP6-Polymerase *in vitro* RNA hergestellt wird (76). Eine lineare SP6-PSTVd-RNA in 1,8facher Viroidlänge war stark infektiös. Die für eine hohe Infektiosität erforderliche Sequenzduplikation des Viroidgenoms konnte von M. Tabler (77) durch Verkürzung der PSTVd-DNA auf den Bereich der oberen zentralen konservierten Region eingengt werden. Diese Region bot sich auch für eine Klonierung an, in ihr liegt die Restriktionsschnittstelle für XmaI (bzw. XcyI); sie existiert nur einmal im PSTVd-DNA-Genom. Die Klonierung über diese Restriktionsschnittstelle hatte auch zu DNA-Klonen von anderen Viroiden, von HLVd und CPFVd, geführt (78). Für die Klonierung der PSTVd-RNA aus den Zelllinien M316 und RK46 wurde der Primer P1 an die obere zentrale konservierte Region der zirkulären Viroid-RNA angelagert und durch Reverse Transkriptase eine cDNA synthetisiert, die durch Verlängerung eines PSTVd-cDNA-spezifischen Rückprimers (KL) mit Klenow-Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt wurde. Die entstandenen PSTVd-DNA-Doppelstränge konnten mit XmaI auf Einheitslänge gekürzt und in ein entsprechendes Derivat des Plasmids pGEM-1, das Plasmid pHal06, inkloniert werden. Die rekombinierte Plasmid-DNA wurde in *E. coli*-Zellen (Stamm JM 83) transformiert. Die Klonierstrategie ist in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt.

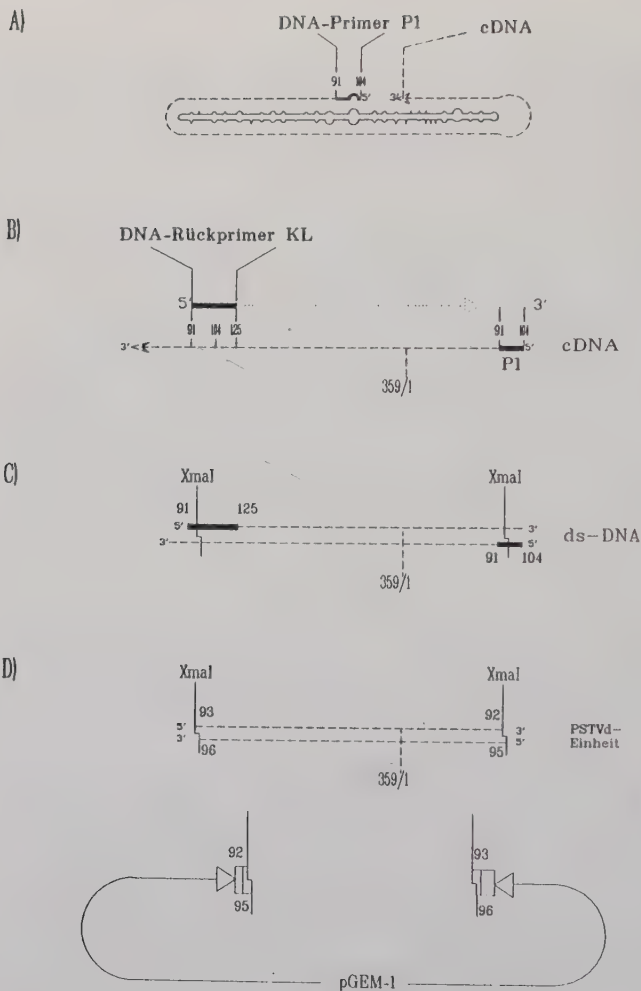


Abb. 16: Schema der Klonierung.

Durch Verlängerung des DNA-Primers P1 durch Reverse Transkriptase entsteht eine cDNA mit Einheits- und Überlänge (A)). An diese wird der DNA-Rückprimer KL hybridisiert und durch DNA-Polymerase die cDNA zum Doppelstrang komplettiert. (B)). Diese Doppelstrang-DNA (C)) wird nach Restriktionsverdau mit XmaI in das ebenfalls mit XmaI geschnittene Plasmidderivat von pGEM-1 eingesetzt (D)).

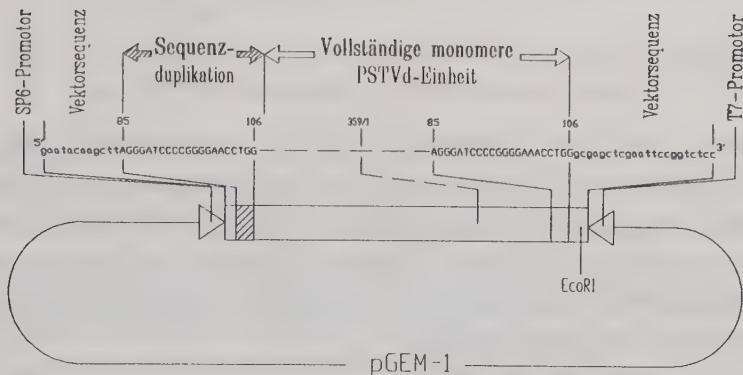


Abb. 17: Der Plasmid-Klon pHa106.

Die Einklonierung der PSTVd-Einheit führt zu einer Sequenzduplikation der Nukleotide 85 bis 106, sie entsprechen der oberen zentralen konservierten Region und sind für die Gewährleistung einer hohen Infektiosität der linearen SP6-PSTVd-RNA notwendig. Die Sequenzduplikation ist in Großbuchstaben dargestellt, die anhängenden Vektorsequenzen jeweils in Kleinbuchstaben. Das Plasmid kann durch Schnitt mit EcoRI-Restriktionsnuklease linearisiert werden, durch SP6-Transkription entsteht dann eine PSTVd-RNA mit definiertem 3' Ende.

Nach Linearisieren der Plasmid-DNA (z.B.: Klon pHa106/66) mit EcoRI und in vitro Transkription mit SP6-Polymerase entstand folgende SP6-PSTVd-RNA:

5'Anfang

|
gaauacaagcuuAGGGAUCCCGGGGAAACUGGAGCGAACUGGCAAAAAAGGACGGUGGGGAGUGCCAGCGGC
CGACAGGAGUAAUCCCGCCGAAACAGGGUUUUCACCCUUCUUUCUUCGGGUGUCUUUCUCGCGCCGCAGGA
CCACCCUCGCCCCUUUGCGCUGUCGCUUCGCGUACUACCCGGUGGAAACAACUGAAGCUCCGAGAACC
GUUUCUCUAUCUUACUUGCUUCGGGGCGAGGGUGUUUAGCCCUUGGAACCGAGUUGGUUCCU^CGGAACUAAACU
CGUGGUUCCUGUGGUUCACACCUGACCUCUGAGCAGAAAAAGAAAAAGAGCGGCUCGGAGGAGCGUUCAGG
GAUCCCGGGGAAACUGGgagcucgaaau

|
3'Ende

Die Nukleotide der PSTVd-Sequenz, sie entsprechen der Sequenz des type strain, sind in Großbuchstaben, die Vektorsequenzen in Kleinbuchstaben geschrieben. Die einklonierte PSTVd-Einheit ist unterstrichen. Die Verbindung von Nukleotid 359 und 1 ist mit ^ gekennzeichnet.

Die Klonierung in das Plasmidderivat pHa106 hatte folgende Vorteile:

- 1) Die PSTVd-DNA ließ sich in einem Schritt in exakter PSTVd-Einheitslänge herstellen, es mußten keine subgenomischen Fragmente kloniert und zu einer Viroideinheit zusammengesetzt werden. Dadurch konnte Viroid-DNA kloniert werden, die der Sequenz einzelner PSTVd-RNAs entsprach.
- 2) Alle Klone besaßen nur eine kurze Duplikation von 12 Nukleotiden in der zentralen konservierten Region; die Sequenzänderungen in der Nachkommenschaft der Zelllinie M316 lagen nicht in diesem Bereich, sie wurden durch die Klonierstrategie nicht beeinflusst.
- 3) Dasselbe Plasmid konnte mit der SP6-Polymerase zu einzelsträngiger RNA der (+)Polarität und mit der T7-Polymerase zu einzelsträngiger RNA der (-)Polarität *in vitro* transkribiert werden. Die erhaltenen

Transkripte besaßen am 5'- bzw. 3'Ende sehr kurze, viroidfremde Sequenzen von insgesamt 33 Nukleotiden (12 Nukleotiden am 5'Ende bzw. 11 am 3'Ende).

- 4) Die rekombinanten Klone konnten direkt aus dem aufgereinigten Plasmid nach Chen und Seeburg (79) sequenziert werden.

5.7.1 Zellkulturvarianten der Zelllinie M316

Die Klonierung der PSTVd-RNA-Nachkommenschaft aus den beiden Zellkulturen erbrachte jeweils 34 rekombinante Bakterienklone, deren Plasmid-DNA isoliert und auf die Insertion von PSTVd-DNA untersucht wurde. 17 Klone aus der Linie M316 und 13 von RK46 hatten PSTVd-DNA integriert. Für die nähere Untersuchung der Plasmid-DNA dieser Klone durch analytische Restriktionsanalyse wurden aus den Klonen mit integrierter PSTVd-Einheit 10 Bakterienkolonien für die Zelllinie M316 und 4 für die Zelllinie RK46 ausgewählt. Sie besaßen die PSTVd-Einheit in der "richtigen Orientierung", sie waren so in die Plasmid-DNA integriert, daß durch SP6-Transkription eine PSTVd-RNA mit (+)Polarität entsteht. Diese Klone wurden in großer Menge angezüchtet und die einklonierten viroidspezifischen Bereiche sequenziert.

Für die Sequenzierung des "oligo-A-Bereichs" und des Übergangs von Vektor-DNA zu PSTVd-DNA wurde der zum T7-Promotor komplementäre DNA-Primer benutzt, zur Bestimmung der PSTVd-DNA, die "stromaufwärts" in Richtung des SP6-Promotors lag, der Sequenzierprimer Se 5, er besitzt die viroidkomplementäre Sequenz zwischen Nukleotid 275 und 256. Damit ließ sich die zweite Hälfte der PSTVd-DNA bis zur Übergangsstelle in den Vektor über den SP6-Promotor hinaus sequenzieren. Für fünf ausgewählte PSTVd-DNA-Klone wurde die Sequenz mithilfe des Sequenzierprimers Se 3 überlappend bestimmt; Se 3 bindet an den Bereich zwischen Nukleotid 41 und 22. Die Lage der Primer im interessanten Plasmidbereich mit der einklonierten PSTVd-Einheit ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

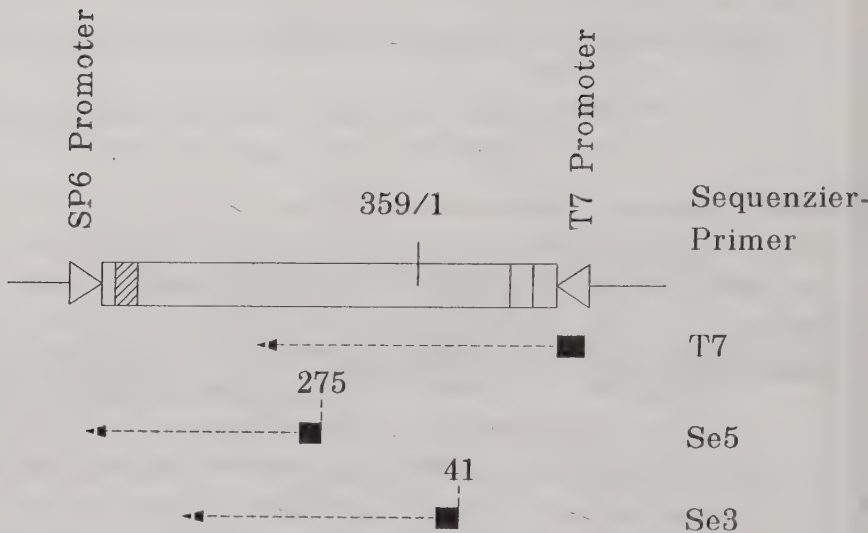


Abb. 18: Bindungsstellen der Sequenzprimer T7, Se 5 und Se 3.

Der Plasmidbereich mit SP6- und T7-Promotor, dem duplizierten PSTVd-Bereich (schraffiert) und mit der PSTVd-DNA-Einheit ist schematisch dargestellt. Die Sequenzierprimer sind als schwarze Blöcke, die Syntheserichtung der DNA-Polymerase ist mit unterbrochenen Pfeilen angedeutet. Die Sequenzprimer Se 5 und Se 3 können sowohl für die Sequenzierung aus dem Bakterienplasmid mit DNA-Polymerase, als auch für die "direkte Sequenzierung" der PSTVd-RNA mit Reverser Transkriptase verwendet werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Die vier PSTVd-Klone aus Zelllinie RK46, Klon 62, 64, 66 und 71 besitzen die unveränderte Sequenz des PSTVd type strain.

Alle PSTVd-DNA-Klone aus M316 haben statt 359 Nukleotiden nur 358, in allen Fällen ist die beobachtete Deletion nicht durch eine Insertion kompensiert worden:

- Sieben der zehn Klone aus Zellkulturlinie M316 (Klon 7, 12, 13, 14, 18, 44 und 46) sind identisch, sie besitzen die PSTVd-Sequenz, die durch die direkte Sequenzierung der PSTVd-cDNA aus der Zellkultur M316 bereits bestimmt worden war. Zusätzlich treten drei Klone mit Sequenzen auf, die weder der Sequenz der PSTVd-RNA der Zelllinie noch der des type strain entsprechen (Klon 11, 52, 41):
- Klon 11 besitzt die Deletion im "oligo-A-Bereich" sowie die Mutationen von Nukleotid 64 und Nukleotid 259. Nukleotid 240 ist identisch mit dem des type strain. Das A₃₁₀ ist zum C₃₁₀ mutiert.
- In Klon 52 ist keine der drei Mutationen im Bereich der RNA-Sequenz, die die unteren Hälfte des Viroidmoleküls bildet, zu finden. Nur die Deletion im "oligo-A-Bereich" zusammen mit der Mutation des G₆₄ zum A₆₄ ist vorhanden, der restliche Teil der Sequenz entspricht damit der Sequenz des type strain.
- Die PSTVd-DNA von Klon 41 besitzt die vollständige type strain Sequenz, jedoch ist im Bereich der Nukleotide 86-88 ein G deletiert; hier sind statt drei Guanosinbasen nur zwei vorhanden.

Die Ergebnisse der Plasmidsequenzierung der ausgewählten PSTVd-Klone sind in Tabelle G zusammengefaßt.

Tabelle G: Ergebnis der Sequenzierung von PSTVd-DNA-Klonen aus den Zellkulturen M316 und RK46.
Die veränderten Nukleotide sind im Vergleich zum PSTVd type strain (eingerahmt) dargestellt.

Klonbezeichnung	Deletion von Nukleotid im Bereich		Mutation bei Position zu Nukleotid			
	55-60	86-88	64	240	259	310
pHa106/						
7, 12, 13, 14, 18, 44, 46,	-A		A	C	T	
11	-A		A		T	C
52	-A		A			
41		-G				
62,64,66,71 *)						
PSTVd type strain	6 A	3 G	G	T	C	A

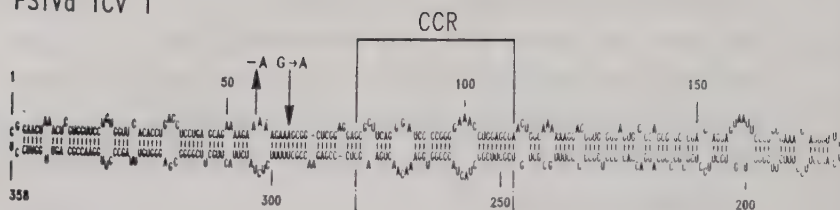
*) Diese PSTVd-DNA-Klone stammen aus der Nachkommenschaft der Zellkulturlinie RK46, sie besitzen die vollständige Sequenz des PSTVd type strain.

Die Sequenz der PSTVd-DNA-Klone wurde "auf dem Papier" in Viroid-RNA zurückübersetzt und die Sekundärstruktur der RNA mit dem Faltungsprogramm nach Zuker and Stiegler (80) berechnet. Die daraus resultierenden Viroid-RNA-Moleküle wurden Zellkulturvarianten (TCV) 1-4 genannt und entsprechend der vorgeschlagenen Einteilung von Keese et al. (81) als Sequenzvarianten bezeichnet, da sie eine definierte Viroidsequenz besitzen und über 90% Sequenzhomologie sowohl untereinander als auch zur Sequenz des type strain aufweisen. Die Umbenennung der DNA-Klone in PSTVd-Sequenzvarianten ist in Tabelle H aufgeführt, die Sequenzfolge und die berechnete Sekundärstruktur in Abbildung 19 dargestellt.

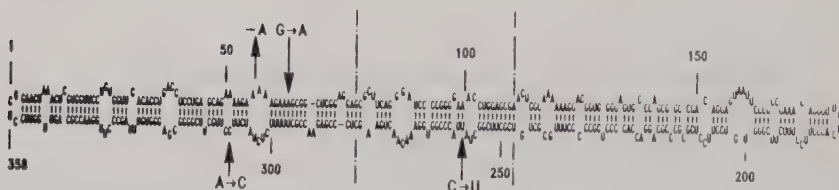
Tabelle H: Einteilung der PSTVd-Sequenzvarianten aus der Zellkultur M316.

PSTVd-DNA des Klons	PSTVd-RNA
pHa106/52	TCV 1
pHa106/11	TCV 2
pHa106/12	TCV 3
pHa106/41	TCV 4
pHa106/66	type strain

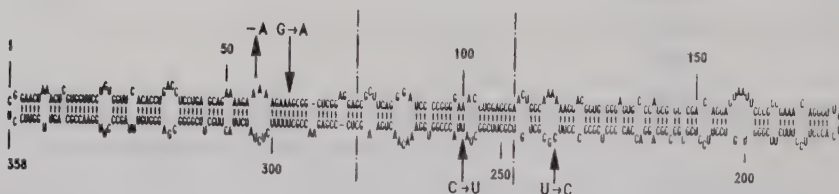
PSTVd TCV 1



TCV 2



TCV 3



TCV 4

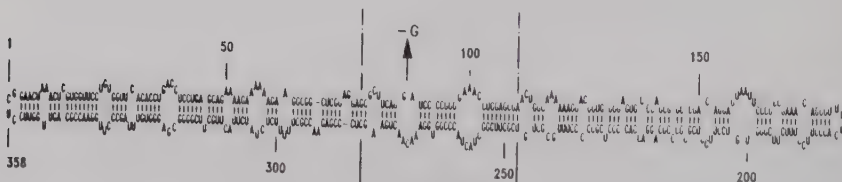


Abb. 19: Sequenz und Sekundärstruktur der Zellkulturvarianten von PSTVd.

Abb. 19:

Die Zellkulturvarianten TCV 1-4, die der Zellkultur M316 entstammen, sind entsprechend ihrer Bezeichnung untereinander aufgereiht. Die Nukleotide werden durch Großbuchstaben dargestellt, die Basenpaarungen durch Striche symbolisiert. Die Basenaustausche sind hervorgehoben und die Mutationsstellen durch einen Pfeil bezeichnet. Die Deletionen sind durch ein Minuszeichen vor dem deletierten Nukleotid und durch Pfeile, vom Deletionsort wegzeigend, dargestellt. Die zentrale konservierte Region (CCR) wird durch eckige Klammern eingegrenzt.

Alle Varianten besitzen nur 358 Nukleotide. TVC 1-3 weisen die Deletion eines Adenosins zwischen Nukleotid 55 und 60 und die Mutation von G₆₄ zu A₆₄ auf; sie unterscheiden sich untereinander im "unteren Strangbereich". TCV 4 besitzt dagegen die vollständige Sequenz des PSTVd type strain, jedoch ist ein Guanosin zwischen Nukleotid 86 und 88 deletiert.

5.7.2 Die Sequenzvariante TCV 4

Die PSTVd-DNA des Klons pHal06/41 zeigt bei genauerer Betrachtung eine Besonderheit. Die Deletion befindet sich in der zentralen konservierten Region (CCR), also im duplizierten Bereich, der bei Nukleotid 85 beginnt und bei Nukleotid 106 endet. So entstammt die Sequenz im vorderen Teil von Nr. 85 bis 92 dem Vektor, nach der Restriktionsschnittstelle von XmaI folgt die einklonierte Viroidsequenz, beginnend bei Nukleotid 93 und die gesamte Viroidsequenz durchlaufend bis zu Nukleotid 92. Daran schließen sich die weiteren Viroidsequenzen der zentralen Region (93-106) an, diese stammen wieder vom Vektor. Die beobachtete Deletion des G₈₆ kommt somit im SP6-Transkript nur im 3'Bereich der verdoppelten CCR vor (vgl.: Darstellung der SP6-PSTVd-RNA in 5.7). Das Plasmid pHal06/41 besitzt also sowohl die Sequenz des PSTVd type strain (von Nukleotid 85 am 5'Ende bis zu Nukleotid 84 im 3'Bereich) als auch die Sequenz der Deletionsmutante PSTVd-TCV 4 (von Nukleotid 87 bis Nukleotid 85 am 3'Ende).

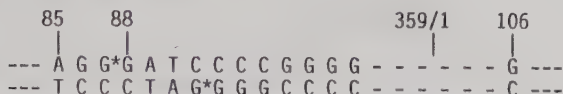
In einem Biotest könnte durch entsprechendes Herausschneiden eine der beiden RNA-Spezies oder beide zusammen in einer Pflanze entstehen und vermehrt werden. Um die biologische Aktivität der Deletionsmutante TCV 4 allein untersuchen zu können, war es notwendig, im 5'Bereich des Klons die Sequenz, die zum PSTVd type strain führen konnte, zu entfernen; gleichzeitig mußte sicher gestellt sein, daß die daraus resultierende SP6-RNA noch immer eine hohe Infektiosität besaß. Diese Kontrolle konnte durch eine gleichartige Behandlung der PSTVd type strain DNA erreicht werden. Bei der zu verändernden Sequenz handelte es sich um die Nukleotide 86-88 am Anfang der viroidspezifischen DNA, eine Veränderung ließ sich auf zwei unterschiedlichen Wegen durchführen:

- 1) Durch einen unvollständigen Restriktionsverdau mit dem Enzym BamHI, das zwischen den Nukleotiden 87 und 88 schneidet, konnte der fragliche Bereich im vorderen Teil der PSTVd-DNA geöffnet werden. Die beiden Schnittstellen der linearen DNA besitzen am 5'Ende des Doppelstrangs vier überstehende Nukleotide, die durch die Einzelstrang abbauende S1-Nuklease entfernt

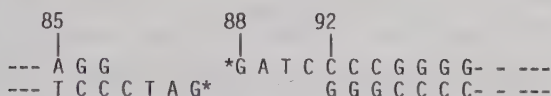
werden. Eine daran anschließende "blunt-end"-Ligation verbindet die "stumpfen" Enden, das Plasmid wird um 4 Nukleotide verkürzt.

In der folgenden schematischen Darstellung sind die 5'Enden der Schnittstelle mit (*) gekennzeichnet, PSTVd-Sequenzen sind in Versalien, Vektorsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Zahlen geben die Position der Nukleotide im PSTVd-Molekül an.

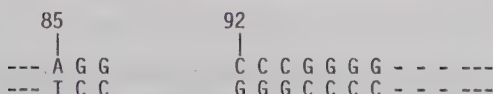
BamHI-Schnitt im 5'Bereich des Klons pHal06:



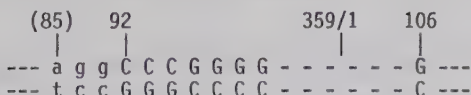
S1-Verdau:



Blunt-end-Ligation:



Neuer Beginn der PSTVd-Sequenz



Die viroidspezifische DNA-Sequenz beginnt bei Nukleotid 92, der duplizierte Bereich reicht bis zu Nukleotid 106. Da diese Manipulation statistisch an beiden BamHI-Schnittstellen im Plasmid stattfindet, mußte durch Restriktionsanalyse der neu entstandenen Klone derjenige gefunden werden, dessen BamHI-Schnittstelle im vorderen Teil der einklonierten PSTVd-DNA zerstört war.

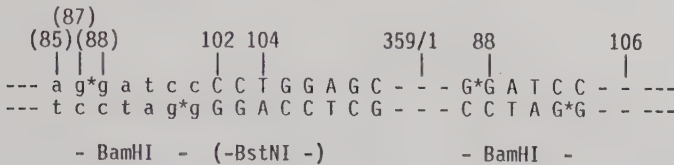
2) Durch die Einklonierung in ein bereits bestehendes Plasmidderivat konnte das G-Nukleotid im vorderen Bereich des Konstruktes deletiert werden. Ein geeignetes Plasmidderivat (pBBs106) war bereits von M. Tabler im Rahmen seiner Dissertation (77) hergestellt worden: Zunächst wurde das Plasmid pSP64 mit der Restriktionsnuklease SmaI im Polylinker durchgeschnitten. In diese Schnittstelle wurde eine monomere PSTVd-Einheit eingesetzt, diese Einheit war durch Bst NI-"Verdau" aus einer PSTVd-DNA mit mehrfacher Einheitslänge gewonnen worden, die Einheit begann mit T₁₀₄, die im Gegenstrang liegende Lücke am 3'Ende war mit Klenow-Polymerase in "glatte Enden" aufgefüllt worden. Durch die Einklonierung über "glatte Enden" begann die PSTVd-Sequenz bei Nukleotid 102 und endete mit Nukleotid 106, die beiden Nukleotide am Anfang (102, 103) und am Ende (105, 106) waren vom Plasmid dazugekommen. Vor der eingesetzten Viroideinheit liegt im Polylinkerbereich die BamHI-Schnittstelle zusammen mit anderen Nukleotiden, die zufällig auch die PSTVd-Sequenz der Nukleotide 85, 87, 88, bis 94 besitzen, neun Nukleotide zwischen 94 und 104 fehlen jedoch, außerdem fehlte auch das G₈₆. Im Bereich von 87 bis 92 besitzt die PSTVd-DNA eine weitere BamHI-Schnittstelle im "hinteren" duplizierten Bereich, sodaß durch vollständigen Verdau ein PSTVd-DNA-Stück aus dem Vektor geschnitten werden kann dem 9 Nukleotide, die Sequenz zwischen 94 und 104, zur Einheitslänge fehlen. Wird das Plasmid pHa106/41 ebenfalls vollständig mit BamHI geschnitten, kann die komplette BamHI-PSTVd-Einheit von Klon 41 gewonnen und in den neuen Vektor eingesetzt werden.

Der viroidspezifische Bereich beginnt dann im Plasmid mit A₈₅ und setzt sich fort mit G₈₇. Durch diese Umklonierung wird im 5'Teil des duplizierten Bereichs nur ein einziges Nukleotid entfernt, im 3'Bereich endet der duplizierte Bereich der CCR mit Nukleotid G₁₀₆. Diese Umklonierung wurde mit der PSTVd-DNA der Klone pHa106/41 und pHa106/66 durchgeführt.

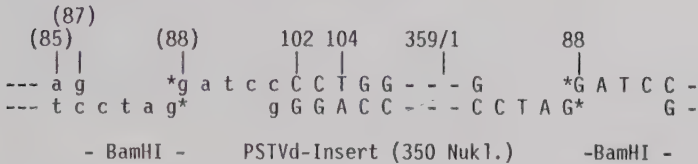
Schematische Darstellung der Umklonierung in den Vektor pBBS106:

Die 5'Enden der BamHI-Schnittstellen sind mit (*) gekennzeichnet, die PSTVd-Sequenz ist in Groß-, die Vektorsequenz in Kleinbuchstaben geschrieben, die Zahlen bezeichnen die Nummerierung im PSTVd-Molekül. Die PSTVd-DNA von Klon 41 ist in Fettschrift gedruckt.

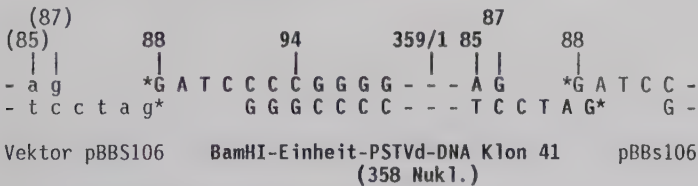
Klon pBBS106:



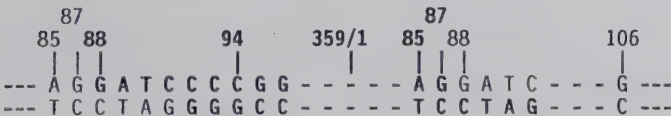
Vollständiger Verdau von pBBS106 mit BamHI:



Ligation von Vektor pBBS106 und BamHI-Einheit von Klon 41:



Ergebnis der Umklonierung:



Klon pBBS106/PSTVd DNA Klon 41

5.7.3 Zusätzliche Herstellung einer dimeren PSTVd-Einheit in pBBs106

Die beschriebene Verkürzung der Duplikation der zentralen konservierten Region könnte im Fall der PSTVd-TCV 4 zum Verlust der Infektiosität führen, da die "normale Processingstelle" zerstört ist. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Viroid-RNA noch an anderen Stellen geschnitten und zum Zirkel ligiert wird. Durch die Verkürzung der verdoppelten Bereiche wäre die benötigte zweite Stelle jedoch nur noch einmal in der SP6-RNA vorhanden. Da *in vivo* im Laufe der Replikation lineare oligomere PSTVd-RNAs der (+)Polarität entstehen, ist es durchaus denkbar, daß die PSTVd-TCV 4 während der Vermehrung in der Zellkultur an einer anderen Stelle auf Einheitslänge zurechtgeschnitten und zum Zirkel ligiert wird. Die benötigte zweite "alternative" Processingstelle könnte in einer SP6-PSTVd-RNA angeboten werden, die mindestens doppelte Einheitslänge besitzt. Ein dimeres Konstrukt müßte die im monomeren Konstrukt verloren gegangene Schneide- und Verknüpfbarkeit und damit die Infektiosität regenerieren und zu einer Nachkommenschaft mit Deletion führen.

Das oben beschriebene Einsetzen der BamHI-Einheit in das Plasmidderivat pBBs106 konnte ebenfalls zu dimeren PSTVd-Molekülen führen. Während des Umklonierens ist es möglich, daß sich zwei BamHI-Einheiten zu einer dimeren PSTVd-DNA aneinanderlagern und in den Vektor eingesetzt werden. Dies trat bei der Umklonierung des type strain auch ein, der Klon wurde entsprechend als pBBs106/6666 bezeichnet. Für den weitaus interessanteren Klon 41 konnte kein solches BamHI-Dimeres gefunden, jedoch einfach hergestellt werden. Das Plasmid pBBs106/41 wurde durch unvollständigen BamHI-Verdau an einer der beiden BamHI-Schnittstellen geöffnet, zu dem linearisierten Plasmid wurden BamHI-Einheiten von Klon 41 gegeben. Die Restriktionsanalyse der erhaltenen Klone ergab, daß in beinahe allen Fällen das zweite BamHI-Insert in der richtigen Orientierung (++) eingesetzt worden war. Der ausgewählte Klon erhielt die Bezeichnung pBBs106/4141.

5.8 Untersuchung auf Infektiosität der SP6-Transkripte aus Klonen, die aus PSTVd-RNA der Zelllinien M316 und RK46 gewonnen wurden

Die Plasmid-DNA der beschriebenen PSTVd-Klone wurde mit der Restriktionsnuklease EcoRI linearisiert. Durch SP6-Transkription wurde von den verschiedenen PSTVd-DNA-Klonen eine lineare PSTVd-RNA erzeugt und in zwei Bio-testserien auf ihre Infektiosität in Tomatenpflanzen der Sorte "Rentita" untersucht (Tabelle I).

Die Nukleinsäuren eines neuentwickelten Blättchens von jeder Versuchspflanze wurden nach vier Wochen extrahiert, in Blattgewichtsäquivalenten verdünnt und mittels Dot-Blot-Analyse durch molakulare Hybridisierung auf Viroidgehalt geprüft. Es wurden zum Teil die gleichen Ergebnisse erzielt wie schon bei den Infektionsuntersuchungen mit isolierter s-RNA der Zelllinien RK46 und M316 (siehe 5.6.1, Abb. 12). Obwohl zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch nicht alle Pflanzen die typischen Krankheitssymptome zeigten, war bereits neusynthetisierte PSTVd-RNA in ihren Blättern nachweisbar. Wieder besaßen Pflanzen, die mit der SP6-RNA der Klone pHa106/11, 12 und 52 (PSTVd-TCV 2, 3 und 1) inokuliert worden waren im Vergleich zu den Pflanzen, die mit SP6-RNA des PSTVd type strain (Klon pHa106/66) inokuliert worden waren, relativ geringe Mengen Viroidnachkommen pro Blattäquivalent. Auch die Testpflanzen innerhalb einer Versuchsreihe besaßen unterschiedliche Mengen an Viroidnachkommenschaft in ihren Spitzenblättern. Nach acht Wochen jedoch zeigten alle inokulierten Pflanzen die PSTVd-spezifischen Krankheitssymptome und alle hatten gleichhohe Viroidkonzentrationen pro Blattäquivalent.

Die mit SP6-RNA des Klons pHa106/41 infizierten Pflanzen müssen davon ausgenommen werden. Vier Wochen nach Inokulation zeigten sieben von zehn Pflanzen starke Hybridisiersignale im Dot-Blot-Test, nach spätestens sechs Wochen traten in diesen Pflanzen Krankheitssymptome auf. Doch im Unterschied zur Infektion der mit der PSTVd-RNA der TCV 1-3 infizierten Pflanzen erkrankten im Laufe der Inkubationszeit keine weiteren Pflanzen mehr. Die drei anderen Pflanzen, zeigten auch nach acht Wochen keine Krankheitssym-

ptome, es konnte kein PSTVd durch molekulare Hybridisierung nachgewiesen werden.

Tabelle I: Biotest mit SP6-RNA-Transkripten von PSTVd-Klonen, die aus den Zelllinien M316 und RK46 isoliert wurden.

Probe	Auftrags- menge in µg	Anzahl der Pflanzen mit viroid- spezifischen Symptomen nach			Infektionsrate
		2,5 W	4 W	8 W	
pHa106/11	1	0	7	10	10/10
pHa106/12	1	0	3	10	10/10
	0,1	0	4	10	10/10
pHa106/66	1	10	10	10	10/10
	0,1	10	10	10	10/10
Mischung aus					
pHa106/12 und	1				
pHa106/66	0,1	10	10	10	10/10
		3 W	6 W	8 W	
pHa106/52	1	0	7	10	10/10
pHa106/41	1	4	7	7	7/10
<u>Kontrollen:</u>					
pHa106/12	1	2	7	10	10/10
pHa106/66	0,1	4	5	5	5/5

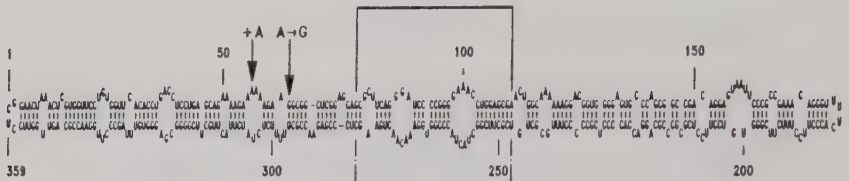
Zehnfach verdünnte SP6-RNA (0,1 µg Auftragsmenge) der PSTVd-RNA-TCV 3 und der PSTVd-RNA type strain hatten die gleiche Infektionseffektivität, alle inokulierten Pflanzen zeigten nach acht Wochen Krankheitssymptome, jedoch ließen alle Tomatenpflanzen, die mit 0,1 µg SP6-RNA des type strain infiziert waren, bereits nach 2,5 Wochen die PSTVd-spezifischen Symptome erkennen; diese traten erst nach vier Wochen bei vier von zehn Testpflanzen, die mit der PSTVd-RNA-TCV 3 inokuliert worden waren auf. Die Infektiosität bei den RNAs war gleich, alle Pflanzen erkrankten, die Zellkulturvariante 3 besaß jedoch offenbar eine verlangsamte Ausbreitungsgeschwindigkeit in den Tomatenpflanzen. In einer Versuchsreihe, bei der eine Mischung aus SP6-RNA des type strain und des PSTVd-TCV 3 auf Testpflanzen gegeben wurde, zeigten alle Pflanzen bereits nach zweieinhalb Wochen Symptome, also genauso schnell wie in den mit PSTVd type strain inokulierten Pflanzen. Die Viroidnachkommenschaft der SP6-RNA des type strain hatte sich in diesen Tomatenpflanzen am schnellsten ausgebreitet, obwohl die Zellkulturvariante 3 in zehnfachem Überschuß im Inokulum vorgelegen hatte; dies konnte durch die Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft in Einzelpflanzen dieser Versuchsreihe eindeutig bestätigt werden.

5.9 Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft der Zellkulturvarianten TCV 1-4

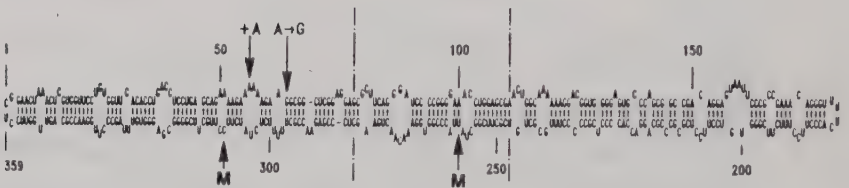
Die Sequenzierung der PSTVd-Nachkommenschaft in ausgewählten, individuellen Pflanzen erfolgte auf die gleiche Weise, wie es zuvor bei den mit s-RNA der Zellkulturen infizierten Tomatenpflanzen durchgeführt worden war. Die Ergebnisse, die für die einzelnen Zellkulturvarianten erzielt wurden, sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Sequenz der PSTVd-Nachkommen wurde erneut in RNA "übersetzt" und in der errechneten Sekundärstruktur dargestellt.

REV TCV 1 = PSTVd type strain

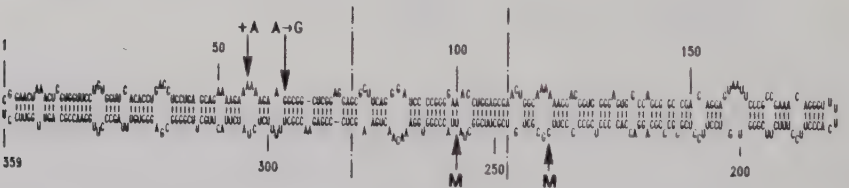
CCR



REV TCV 2



REV TCV 3



REV TCV 4 = PSTVd type strain

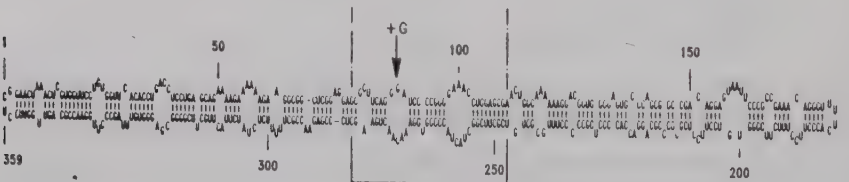


Abb. 20: Sequenz und Sekundärstruktur der PSTVd-Nachkommenschaft der Zellkulturvarianten in Tomatenpflanzen.

Abb. 20:

Die PSTVd-Nachkommen in den Pflanzen, die aus der SP6-PSTVd-RNA der unterschiedlichen Zellkulturvarianten entstanden, erwiesen sich als Revertanten (REV), sie besitzen wieder 359 Nukleotide. Sie werden ihren "Vorfahren" entsprechend (vgl. Abb. 19) als REV TCV 1-4 bezeichnet und untereinander aufgereiht. Die Nukleotidsequenz wird durch Großbuchstaben und die Basenpaarungen, die zur Sekundärstruktur führen, durch Striche symbolisiert. Die Rückmutationen und Insertionen werden durch Pfeile angezeigt, die zentrale konservierte Region (CCR) ist durch Klammern eingegrenzt.

Deletion und Mutation im "oligo-A-Bereich" sind in REV TCV 1, 2 und 3 wieder vollständig zur Sequenz des PSTVd type strain zurückmutiert. REV TCV 1 ist somit identisch mit dem PSTVd type strain. Die weiteren Mutationen, die sich bei TCV 2 und 3 im Bereich der Sequenz befinden, der den unteren Teil des Stäbchens ausbildet, sind in der REV TCV 2 und 3 unverändert erhalten geblieben, sie sind gesondert durch einen Pfeil und mit M markiert. Bei REV TCV 4 ist die Deletion des Guanosins ebenfalls "repariert" worden, REV TCV 4 ist somit identisch mit dem PSTVd type strain.

5.10 Untersuchung der SP6-Transkripte nach Umklonierung in Klon pBBs106

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die SP6-RNAs der Umklonierungsansätze für die Deletionsmutante Klon 41 im Biotest analysiert. Die Analyse der Nachkommenschaft in mit SP6-RNA des Klons pHal06/41 inokulierten Pflanzen hatte ergeben, daß die Nachkommenschaft aus PSTVd type strain bestand. Durch die Duplikation in der CCR waren jedoch beide Sequenzen gemeinsam in der SP6-RNA vorhanden, ein Herausschneiden der PSTVd type strain Sequenz konnte direkt zu dieser Nachkommenschaft in den Pflanzen geführt haben. Die Umklonierung in das Plasmidderivat pBBs106 zerstörte diese Sequenzduplizität. Die eingeführte Deletion im vorderen Bereich der duplizierten Sequenz besitzt keinen Einfluß auf die Infektiosität, dies zeigt die unverändert hohe Infektiosität der SP6-Transkripte des Kontrollklons pBBs106/66. Die Ergebnisse von zwei Biotestserien sind in Tabelle J aufgeführt. Klon pBBs106/41, der die Deletion des G₈₆ im vorderen und im hinteren Bereich der CCR besitzt, war weiterhin stark infektiös. Sieben von fünfzehn Pflanzen zeigten bereits nach drei Wochen, neun von fünfzehn Pflanzen nach fünf Wochen Krankheitssymptome. Damit war der deletierte Klon stärker infektiös als der Ausgangsklon pHal06/41. Die Sequenz der PSTVd-RNA aus mehreren infizierten Pflanzen dieser Versuchsreihen wurde erneut bestimmt. In keinem Fall fand sich in der Nachkommenschaft die Sequenz der Zellkulturvariante TCV 4, immer war der Einbau eines Guanosins in den Bereich 86-88 erfolgt, alle Pflanzen enthielten die Sequenz des PSTVd type strain. Das dimere SP6-Transkript besaß überraschenderweise eine stark verminderte Infektiosität, nur in zwei von zehn Pflanzen konnte neusynthetisierte PSTVd-RNA nachgewiesen werden; diese beiden infizierten Pflanzen enthielten PSTVd mit der Sequenz des type strain. Zehnfach verdünnt war dieses SP6-Transkript nicht mehr infektiös, keine der inokulierten Pflanzen erkrankte. Die dimere PSTVd-RNA des type strain (pBBs106/6666) war dagegen unverändert hoch infektiös.

Tabelle J: Biotest mit SPG-RNA-Transkripten, die durch Umklonierung des Klons pHa106/41 in das Plasmid pBBs106 entstanden sind.

Probe	Auftrags- menge in µg	Anzahl der Pflanzen mit viroid- spezifischen Symptomen nach			Infektionsrate
		3 W	4 W	5 W	
pBBs106/41	1	7	7	9	9/15
pHa106/41	1	2	3	3	3/10
pBBs106/66	1	15	15	15	15/15
pHa106/66	0,1	5	5	5	5/5
		2 W	3 W	4 W	
pBBs106/4141	1	0	2	2	2/10
	0,1	0	0	0	0/5
<u>Kontrollen:</u>					
pBBs106/6666	1	9	10	10	10/10
	0,1	1	3	5	5/5
pHa106/66	0,1	1	5	5	5/5

Es befanden sich somit zwei Arten von Deletionsmutanten in der Zellkulturreihe, die sich in ihrer Sequenz und in ihrem Infektionsverhalten auf Tomatenpflanzen deutlich unterscheiden:

1) Die "oligo-A"-Deletionsgruppe.

Die Zellkulturvarianten PSTVd-TCV 1-3 besaßen als gemeinsames Charakteristikum die Deletion eines Adenosins im "oligo-A-Bereich" sowie eine Mutation von A₆₄ zu G₆₄. Neun von zehn DNA-Klonen wiesen diese Sequenzänderung auf, acht davon eine Mutation im unteren Bereich der konservierten Region. Sieben DNA-Klone besaßen die identische Sequenz, mit einer weiteren Mutation bei Nukleotid 240. Diese PSTVd-Variante der Zellkultur, die PSTVd-TCV 3, entsprach damit der Mehrheit der Viroid-RNA-Moleküle, die sich im Laufe von acht Jahren in der Zelllinie M316 entwickelt hatten. Es entsprach gleichzeitig der Sequenz, die zuvor "direkt" aus der Zellkulturlinie M316 bestimmt worden war. Alle Varianten dieser Gruppe besaßen eine Infektionsrate von 100%, die Symptome traten jedoch im Vergleich zum PSTVd type strain verzögert auf. Dies spiegelte sich auch in der geringen Viroidkonzentration pro Blattäquivalent vier Wochen nach Infektion wider. Die in den einzelnen Pflanzen nach acht Wochen entstandene Nachkommenschaft entsprach im gesamten "oligo-A-Bereich" in allen Fällen wieder dem PSTVd type strain, Deletion und benachbarte Mutation waren verschwunden. Die Mutationen im unteren Bereich des Viroidstäbchens waren in der Nachkommenschaft in den Pflanzen nicht verändert worden.

2) Die Gruppe mit der Deletion eines Guanosins im Bereich der oberen zentralen konservierten Region bestand aus nur einem Klon.

Die aus diesem Klon resultierende PSTVd-TCV 4 war ebenfalls als SP6-Transkript für Tomatenpflanzen infektiös, es erkrankten jedoch nur 30-70% einer Versuchsreihe; daran änderte sich auch nach einer Verlängerung der Inkubationszeit der Versuchspflanzen auf sechs Wochen nichts. Die dimeren SP6-RNAs dieser Variante besaßen eine wesentlich niedrigere Infektionsrate. Die Nachkommenschaft besaß in allen Fällen die identische Sequenz des PSTVd type strain, die Deletion war ausgeglichen worden.

6. DISKUSSION:

6.1 Infektion von Protoplasten mit PSTVd-RNA

Die Zirkularität der Viroid-RNA sowie die Existenz langer, viroidkomplementärer RNAs führten zu der Vorstellung, daß die Viroidvermehrung in den Pflanzenzellen in einem "rolling-circle"-ähnlichen Mechanismus abläuft. Da nicht in eine DNA-Zwischenstufe überschrieben wird und die Viroid-RNA für keine Replikase kodiert, müssen die erforderlichen RNA-RNA-Transkriptionsschritte durch wirtseigene Polymerasen erfolgen. Die Hemmung der Viroidvermehrung in Protoplasten und isolierten Zellkernen mit alpha-Amanitin hatte ergeben, daß die PSTVd-Replikation von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II bewerkstelligt wird (vergleiche Einleitung).

Die verschiedenen Abschnitte der Vermehrung von PSTVd-RNA in Pflanzenzellen sind schematisch in Abb. 21 auf der nächsten Seite dargestellt:

Das zirkuläre PSTVd-RNA-Molekül (A)) wird in einem ersten Transkriptionsschritt in ein lineares Molekül mit komplementärer Sequenz ((-)PSTVd) überschrieben (B)). Durch die fortlaufende Transkription wird der PSTVd-Zirkel "weitergedreht", es entsteht ein Molekül mit hintereinanderhängenden Viroideinheiten. Dieses Molekül dient erneut als "Matrize", eine erneute Transkription (C)) liefert lineare (+)PSTVd-RNA mit mehrfachen Viroideinheiten. Viroid-RNA in Einheitslänge wird daraus herausgeschnitten und abschließend zum zirkulären Molekül verknüpft (D)). Die neuentstandenen PSTVd-Zirkel können in einen neuen Vermehrungszyklus eintreten.

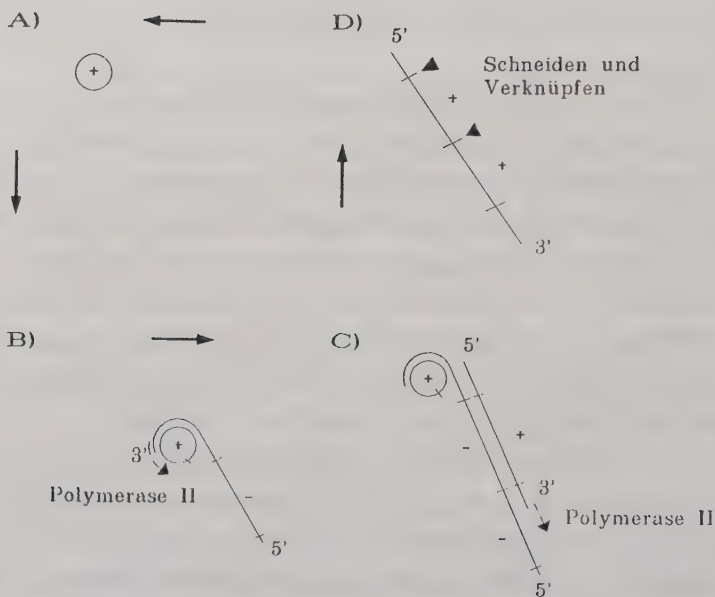


Abb. 21: Schematische Darstellung der Vermehrung von PSTVd-RNA.

6.1.1 Zwischenstufen der PSTVd-Replikation

Durch "Flüssig-Flüssig-Verteilungs-Chromatographie", einem wässrigen Zweiphasen-System mit PEG/Dextran (71), waren große Mengen zellulärer Nukleinsäuren sowie die darin enthaltene Viroid-RNA der permanent infizierten Zelllinie M316 ihrer Größe entsprechend aufgetrennt worden. Die linearen (-)PSTVdRNAs eluieren nach ihrer Länge verteilt aus der Chromatographiesäule, während die Hauptmenge der monomeren zirkulären PSTVd-(+)RNA bereits sehr früh (Fraktionen 7-15) abgetrennt worden war.

In allen Fraktionen mit oligomerer (-)RNA war gleichzeitig zirkuläre, monomere (+)RNA vorhanden. Ausgewählte Fraktionen dieser Auftrennung wurden von H.-P. Mühlbach (82) mit Ribonukleasen, die spezifisch nur Einzel- oder Doppelstrangbereiche abbauen, untersucht. Die Analyse zeigte, daß die oligomeren (-)Moleküle mit den monomeren (+)Zirkeln teilweise gepaart vorliegen. Geringe Mengen von Nukleinsäuren und Viroid-RNA, wie sie in frisch infizierten Protoplasten in der frühen Phase der Viroidreplikation entstehen, können über Saccharosedichte-zentrifugation unter Bedingungen aufgereinigt werden, die bestehende Basenpaarungen nicht trennt. Unter den optimierten Bedingungen erfolgte eine Auftrennung der langen (-)Oligomeren in die saccharosedichtereren Fraktionen; die Hauptmenge der monomeren Zirkel befand sich noch im oberen Teil des Gradienten, kleine Mengen waren jedoch auch in den tiefen Fraktionen nachweisbar. Damit wurden durch Zentrifugation und durch Chromatographie die gleichen Verteilungsmuster erzielt. Dies läßt den Schluß zu, daß die lange PSTVd-(-)RNA in den "tiefen" Fraktionen mit hoher Saccharosekonzentration, mit der (-)RNA in den "späten" Fraktionen der Säulenchromatographie identisch ist, damit kann gefolgert werden, daß sie genauso mit der gleichzeitig vorhandenen, zirkulären PSTVd-(+)RNA in partiellen RNA-RNA-Doppelsträngen vorliegt. Damit könnte auch erklärt werden, warum ein Teil der monomeren, zirkulären PSTVd-(+)RNA so tief in den Gradienten hineinwanderte.

4

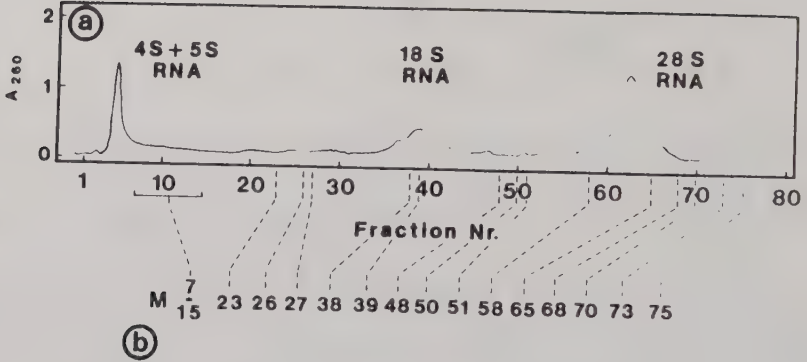


Abb. 22: Auftrennung von Nukleinsäure aus PSTVd-infizierten Kartoffelzellen.

Abb. 22:

Die Auftrennung zellulärer Nukleinsäure durch Säulenchromatographie erfolgte in einem Dextran/PEG-Zweiphasensystem unter nicht strangtrennenden Bedingungen. Das Elutionsprofil ist in (a) dargestellt. Ausgewählte Fraktionen wurden nach Denaturierung der Nukleinsäure durch Gelelektrophorese in 2% Agarose aufgetrennt, und die PSTVd-(+)- und -(-)RNA strangspezifisch mit Northern Hybridisierung analysiert. Die linearen oligomeren Formen der (-)PSTVd-RNA eluieren ihrer Länge entsprechend aus der Trennsäule. In allen diesen Fraktionen kann gleichzeitig monomere (+)PSTVd-RNA nachgewiesen werden, die "freie" PSTVd-RNA wird dagegen schon sehr früh durch die Chromatographie abgetrennt. Die Abbildung stammt aus einem Poster, das 1987 in Kopenhagen präsentiert wurde (82).

6.1.2 Zeitlicher Verlauf der PSTVd-Vermehrung

Nach dem Replikationsmodell von Branch und Robertson (27) kann die Viroidvermehrung in zwei Hauptphasen unterteilt werden. Zunächst entsteht oligomere (-)RNA, die zweite Phase führt zu oligomerer (+)RNA, die weiter zum zirkulären, monomeren Viroidmolekül "reift". Bisher wurden nur aus infizierten Pflanzen und Zellkulturen isolierte Replikationsintermediäre aufgereinigt. Wenn die Replikation nach dem rolling-circle-Mechanismus abläuft, müssen diese Replikationsphasen während einer Neuinfektion zu verschiedenen Zeiten nachweisbar sein.

Für einen simultanen Start der Viroidreplikation in einer großen Zahl von Zellen wurden deshalb Protoplasten mit Viroid-RNA inokuliert. Nach Inokulation von Protoplasten mit PSTVd-RNA wurde in einer Zeitreihe im Dot-Blot sowie nach gelelektrophoretischer Auftrennung die unterschiedlichen PSTVd-Moleküle strangspezifisch nachgewiesen. Es ergab sich, daß nach vierundzwanzig Stunden eine Population von PSTVd-komplementären, linearen Molekülen unterschiedlicher Länge neu entstanden war. Durch die Inokulation mit monomerer (zirkulärer und linearer) PSTVd-RNA war in den Protoplasten die erste Stufe der Replikation initiiert worden, die Synthese von linearer, komplementärer Viroid-RNA. Die Vermehrung von PSTVd-(+)RNA war nicht nachweisbar, der Gehalt an inokulierter Viroid-(+)RNA war zu diesem Zeitpunkt sogar zurückgegangen. Besonders stark war die lineare monomere Form abgebaut worden, ein weiterer Hinweis dafür, daß ein Teil der zirkulären PSTVd-RNA im Zellkern aktiv an der Replikation beteiligt und möglicherweise dadurch dem "Zugriff" endogener Nukleasen entzogen und so vor Abbau geschützt war.

Die frühen Stufen in der PSTVd-Vermehrung wurden zusätzlich durch Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Diese "horizontale Auftrennung", der Länge der Nukleinsäuren entsprechend, führte zu einer Fraktionierung der Gesamtnukleinsäure und der verschiedenen PSTVd-Formen, ohne jedoch die bestehenden Basenpaarungen zu zerstören. Der Hauptanteil der inokulierten, monomeren PSTVd-(+)RNA befand sich im oberen Teil des Gradienten mit geringem Saccharosegehalt, hier sammelt sich normalerweise die

freie, monomere, nicht komplexierte PSTVd-RNA. Geringe Mengen der monomeren Viroid-RNA wurden jedoch im unteren Bereich des Gradienten aufgefunden, in Fraktionen gemeinsam mit den neuentstandenen oligomeren PSTVd(-)-RNAs. Diese *de novo* entstandenen langen (-)PSTVd-RNAs mußten mit den PSTVd-Zirkeln des Inokulums über Basenpaarungen zusammenhängen und hatten diese tief in den Gradienten "hineingezogen".

Die erste Stufe der PSTVd-Replikation läuft über einen "rolling circle" ab, die monomere, zirkuläre (+)PSTVd-RNA dient als Template für die (-)Strangsynthese. Diese Replikationsintermediären vierundzwanzig Stunden nach Inokulation liegen in sehr geringen Mengen vor, eine direkte Analyse durch spezifische RNase-Verdaus oder eine erneute Dichtegradientenzentrifugation einzelner Fraktionen mit oder ohne vorherige Denaturierung waren nicht möglich. Die für diese Analysen benötigten Mengen können nur aus permanent infizierten Zellen oder Protoplasten drei Tage nach Inokulation gewonnen werden. Der Verlauf der frühen Vermehrungsphase könnte mit "pulse-chase"-Versuchen weiter untersucht werden. Radioaktiv markierte Nukleotide werden 12 bis 36 Stunden nach Inokulation mit PSTVd zu den Protoplasten gegeben, der Nachweis der neusynthetisierten Nukleinsäuren erfolgt nach Extraktion, Dichtegradientenzentrifugation, Gelelektrophorese und Elektroblothing durch direkte Autoradiographie; auch die *de novo* entstandenen PSTVd(-)RNAs müßten dann radioaktiv markiert sein und zu einer Schwärzung des Röntgenfilms führen. Nach dem Abklingen der in die Nukleinsäuren eingebauten Radioaktivität erfolgt der strangspezifische PSTVd-Nachweis durch Northern Hybridisierung; die (+)RNA des Inokulums sollte erst jetzt nachweisbar sein, die neue (-)PSTVd-RNA in den unteren Gradientenfraktionen sollte, gemeinsam mit kleinen Mengen (+)RNA des Inokulums, erneut "aufleuchten".

Nach erfolgter Synthese von oligomeren komplementären RNAs sollte die zweite Phase der Viroidvermehrung, die Synthese der oligomeren (+)PSTVd-RNAs beginnen. Aus dem rapiden Anstieg der monomeren (+)RNA läßt sich schließen, daß dieser Vorgang am zweiten Tag, also 48 Stunden nach Inokulation, in vollem Gang war. Zu diesem Zeitpunkt war oligomere und vermehrt monomere (+)RNA nachweisbar. Wahrscheinlich erfolgt die Neusynthese dieser linearen, oligomeren (+)RNA direkt am (-)Strang, es entstehen lineare PSTVd-RNA-Doppelstränge.

Bei dieser Vermehrungsstufe könnte aber auch eine zirkuläre (-)PSTVd-RNA in einem zweiten "rolling-circle-Mechanismus" als Template dienen. Gegen die Anwesenheit einer zirkulären PSTVd(-)-RNA sprechen jedoch folgende Überlegungen:

- 1) Eine definierte PSTVd(-)-RNA mit Einheitslänge ließ sich nicht nachweisen.
- 2) Die Zirkularisierungseffizienz der linearen, oligomeren (-)Moleküle ist *in vitro* im Vergleich zu oligomeren (+)RNAs 50 bis 100 mal geringer (71). Sie wäre damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Replikation. Eine große Anzahl linearer, oligomerer (-)RNA wäre nötig, um die Bildung einer ausreichend großen Menge von (-)Zirkeln sicherzustellen.
- 3) Das zirkuläre (-)Template müßte bevorzugt transkribiert werden, damit der nach 48 Stunden beobachtete steile Anstieg der PSTVd-(+)Einheiten möglich ist.
- 4) Die Vorstufen dieser Einheiten, die oligomeren (+)RNAs, sollten während der frühen Replikationsphase in großen Mengen angereichert nachweisbar und ähnlich wie die verschiedenen langen, oligomeren (-)Moleküle im Gradienten verteilt sein. Die höhermolekularen Formen der oligomeren (+)RNAs waren aber nach 48 Stunden nur in geringen Mengen, im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt, nachweisbar.
- 5) Oligomere (-)PSTVd-RNAs sind, auch in hohen Konzentrationen, nicht in der Lage, Pflanzen zu infizieren (76); durch "Processing" sollten aber daraus zirkuläre (-)Monomere entstehen, die durch einen effektiven "rolling-circle-Mechanismus" (siehe 2)) zu den hochinfektiosen, oligomeren (+)PSTVd-RNA-Molekülen führen. Diese könnten weiter zu monomeren (+)PSTVd-RNA-Zirkeln "reifen".

Dennoch kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, daß der Nachweis kleiner Mengen monomerer zirkulärer (-)PSTVd-RNA mit molekularer Hybridisierung verhindert wird (83). Die radioaktiven Sonden können nicht binden, da die im Überschuß vorhandene PSTVd-(+)RNA an die zirkuläre, monomere (-)RNA hybridisiert, sie damit abschirmt, sie "maskiert". Durch die Auftrennung im Saccharosegradienten würde eine monomere (-)RNA immer in dieselben Fraktionen wie das (+)Monomere hineinwandern und damit eine Abschirmung ermöglichen.

Auch könnten die in einem zweiten "rolling circle" entstehenden linearen, oligomeren (+)RNAs über sehr effiziente Processingschritte sofort in monomere Zirkel umgewandelt werden, die langen oligomeren (+)RNAs wären deshalb nicht in großer Menge nachweisbar.

Die Existenz von monomerer, zirkulärer (-)PSTVd-RNA kann nur durch direkten Nachweis in infiziertem Pflanzengewebe erfolgen. Dazu ist es notwendig, die PSTVd-(-)RNA mit kurzen PSTVd-DNA-Sequenzen aus großen Mengen Viroid-RNA zu "fischen", und so von der Hauptmenge der zirkulären (+)RNA abzutrennen. Die Auftrennung in denaturierenden Gelsystemen und (-)PSTVd-spezifischen Northern Hybridisierungen könnte dann zu einer genaueren Charakterisierung der (-)RNAs führen.

Ein anderer Weg, die zweite Stufe der Replikation zu untersuchen, wäre die Isolierung und Charakterisierung von oligomerer, linearer (-)RNA, die in doppelsträngigen RNA-Bereichen mit linearer (+)RNA zusammenhängen muß. Damit könnte gezeigt werden, daß in der zweiten Replikationsphase eine direkte Transkription an den langen oligomeren (-)PSTVd-Templates stattfindet und kein zweiter rolling-circle-Mechanismus aktiv ist. Aus diesen Formen könnten die Replikationsintermediären, die in den tiefen Schichten des Saccharosegradienten 48 Stunden nach Inokulation zu finden sind, bestehen; die Fraktionen könnten durch spezifische RNase-Verdaus näher untersucht werden. Die Synthese der langen PSTVd-(+)RNA scheint schon sehr bald nach der Synthese der oligomeren (-)RNA zu beginnen, die geringen Mengen sind wahrscheinlich noch nicht durch molekulare Hybridisierung nachweisbar. Zur Vorstellung, daß die oligomere PSTVd-(+)RNA direkt an den linearen (-)Oligomeren entsteht, paßt die Beobachtung, daß nach Anlagerung von kurzen, nichtinfektiösen PSTVd-(+)RNA-Fragmenten an die ebenfalls nichtinfektiösen, oligomeren (-)RNAs Infektionen in Tomatenpflanzen erzielt werden können (75). Die RNA-Polymerase II benötigt vielleicht einen RNA-Doppelstrangbereich, um an den (-)RNA-Oligomeren entlang oligomere PSTVd-(+)RNA herzustellen, diese können dann zu den infektiösen zirkulären PSTVd-Molekülen "reifen".

6.1.3 Übergang zur permanent infizierten Zellkultur

Die PSTVd-Replikation hatte nach zwei Tagen zu einem deutlichen Anstieg beider Viroid-RNA-Polaritäten geführt. Die Dichtegradientenauftrennung am dritten Tag nach Inokulation zeigte das typische Verteilungsmuster, wie es auch in permanent infizierten Zellen zu finden war, alle Replikationsphasen waren vorhanden. Allerdings waren auch vermehrt Viroid-RNAs nachweisbar, die kürzer als Einheitslänge waren; dieses Muster, das permanent infizierte Zellen nicht zeigen, kann durch die hohe Auf- und Abbauaktivität während der Replikation in den frisch infizierten Protoplasten entstanden sein. Im Verlauf der Zellregeneration nahm die Menge an PSTVd-(+)RNA weiter zu, der Gehalt an PSTVd-(-)RNA als mögliche Replikationszwischenstufe war nach sieben Tagen in den regenerierten Zellen jedoch deutlich zurückgegangen. Zu diesem Zeitpunkt war das Stadium einer "normalen" permanenten PSTVd-Infektion erreicht, die Viroidreplikation befand sich in einem "steady-state"-ähnlichen Zustand, sie hatte sich an die Nukleinsäurevermehrung in der Zelle angepaßt. Die "reifen" monomeren, zirkulären Viroidmoleküle wurden wahrscheinlich im Nukleolus "abgelagert", eine Vermehrung von Viroid-RNA war gedrosselt und nur noch für die Weitergabe an die Tochterzellen nötig. Schüttelkulturen, die aus infizierten und nichtinfizierten Zellen zusammengesetzt waren, besaßen auch nach einem Jahr kontinuierlicher Kultur den gleichen PSTVd-Gehalt; unter den angewandten Kulturbedingungen bestanden wahrscheinlich weder für infizierte noch für gesunde Zellen Selektionsvorteile. Die PSTVd-RNA war zudem nicht in der Lage, sich in der Zellkultur durch "horizontale Weiterinfektion" auszubreiten und andere gesunde Zellen zu infizieren. Kallus- und Suspensionskulturen mit permanenter PSTVd-Infektion können lange Zeit als undifferenziertes Pflanzengewebe weitervermehrt werden, ihr Wachstum wird offensichtlich durch die Anwesenheit und Vermehrung der PSTVd-RNA im Zellkernen nicht beeinträchtigt. Eine Einwirkung der Viroidinfektion auf zelluläre Vorgänge war jedoch bei Protoplasten, die aus permanent infizierten Zellkulturen gewonnen wurden, zu beobachten. Ihre Fähigkeit wieder zu Kalluszellen zu regenerieren, war stark eingeschränkt. Ob diese Blockierung der Regeneration frühe Stufen der Zellwandbiosynthese oder die Aufnahme der erforderlichen Nährstoffe beein-

trächtigt oder generell Zellteilungs- bzw. Zelldifferenzierungsprozesse behindert, war aus den Untersuchungen nicht zu erkennen.

Die Erkenntnisse über die frühen Phasen der PSTVd-Replikation führen weiter zu folgenden Fragen:

Welche Sequenzbereiche im Viroidmolekül sind an der Anlagerung der RNA-Polymerase II und der Transkriptionsfaktoren beteiligt? Gibt es eine spezifische Initiationsstelle, wo liegt sie? Wie fügt sich die permanente Viroidreplikation in den normalen Zellvermehrungsprozeß? Auf welcher Stufe der Zelldifferenzierung führt die Viroidinfektion zur Symptomausprägung, welche Zellfaktoren treten dabei mit dem Viroid in Wechselwirkung?

6.2 Klonierung und Sequenzierung von PSTVd-Nachkommenschaft aus Zellkulturen und Tomatenpflanzen

Die Sequenz der PSTVd-Nachkommenschaft in der permanent infizierten Zelllinie M316 der Wildkartoffel *Solanum demissum* hatte sich gegenüber der Sequenz des ursprünglichen Inokulums verändert. Die Klonierung von PSTVd-DNA aus dieser Zelllinie führte zur Isolierung von mehreren Sequenzvarianten. Sieben von zehn DNA-Klonen besaßen eine identische Sequenz, drei wiesen Abweichungen auf. Da neun der zehn PSTVd-DNA-Klone dieselben Veränderungen im "oligo-A-Bereich" (50-64) besaßen, existierten diese Deletion und Mutation sicherlich schon lange in der Zellkultur. Die Mutation im unteren Teil der zentralen konservierten Region (C₂₅₉ zu U₂₅₉) war ebenfalls früh aufgetreten, sie wurde in acht von zehn Klonen gefunden. Auch die Mutation bei Nukleotid 240 hatte sich in vielen PSTVd-Molekülen durchgesetzt, die Mutation bei Nukleotid 310 im unteren Strangbereich trat dagegen nur in einem Fall auf. Ein Klon, die Zellkulturvariante TCV 4 besaß keine dieser Veränderungen, ihre Sequenz war identisch mit der des type strain, jedoch fehlte ihr ein Nukleotid im oberen Teil der zentralen konservierten Region. Aufgrund dieser Unterschiede lassen sich die Varianten in zwei Gruppen unterteilen.

6.2.1 Charakterisierung der Zellkulturvarianten TCV 1-3, die Gruppe der "oligo-A-Varianten"

Die Gruppe der "oligo-A-Varianten" wies im Biotest ein homogenes Infektionsverhalten auf. Alle Pflanzen, die mit der PSTVd-RNA von TCV 1, 2 und 3 inokuliert wurden erkrankten, zeigten jedoch später als die Kontrollpflanzen, die mit dem type strain inokuliert wurden, die typischen Krankheits-symptome. In allen Fällen war bei der Nachkommenschaft des Inokulums die Deletion und Mutation im "oligo-A-Bereich" in allen Pflanzen revertiert, die Mutationen in der RNA-Sequenz, die den unteren Teil des Viroidstäbchens bildet waren dagegen stabil.

6.2.2 Die Rückmutation und Funktion des "oligo-A-Bereichs"

Für die Rückmutationen im "oligo-A-Bereich" im linken oberen Teil des Viroidstäbchens kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht:

1) Die veränderte Region der Zellkulturvariante war über eine RNA-RNA-Rekombination (84) durch eine RNA, die bereits in der Pflanze vorhanden war, ersetzt worden: Eine Rekombination mit zellulärer RNA ist wahrscheinlich nur möglich, wenn diese direkt neben der Austauschsequenz weitere Sequenzen mit hoher Viroidähnlichkeit besitzt. Thomas Herold (52) gelang der Nachweis einer kleinen RNA in Tomatenproben, die unter stringenten Hybridisierungsbedingungen PSTVd-RNA bindet. Die Sequenzierung und Klonierung dieser zellulären RNA ergab jedoch nur einen kurzen Ähnlichkeitsbereich von ca. 15 Nukleotiden mit Sequenzen im rechten unteren Teil des PSTVd-Stäbchens, nicht jedoch im "oligo-A-Bereich", im linken oberen Teil (pers. Mitteilung). Auch eine Rekombination mit einer anderen Viroid-RNA ist denkbar. Hammond et al. (85) fanden in der Zierpflanze *Columnea erytrophae* eine Viroid-RNA (*Columnea Latent Viroid* (CLVd)), die in dieser Pflanze keine Krankheitssymptome hervorruft. Ihre Nukleotidsequenz stellte sich als "Mosaik" aus den vier bereits bekannten Viroiden HSVd, TASVd, TPMVd und PSTVd dar. Diese "neue" Viroid-RNA könnte durch RNA-Rekombination aus diesen vier verschiedenen Vi-

roiden entstanden sein. Holger Puchta et al. fanden in Hopfenproben ebenfalls ein latentes Viroid (HLVd), dessen RNA durch molekulare Hybridisierung in fast allen Hopfenkulturen der Welt nachgewiesen werden konnte (86). Diesem Viroid, das keinerlei Symptome in den Kulturhopfenpflanzen hervorruft, fehlt allerdings der "oligo-A-Bereich". Ob die Latenz mit dieser Sequenzbesonderheit zusammenhängt, ist noch nicht geklärt worden. Eine latente Viroid-RNA in Tomatenpflanzen wurde bisher nicht nachgewiesen.

2) Die "Reparatur" wird von zelleigenen Nukleasen und Polymerasen im Verlauf der Viroidreplikation durchgeführt: Eukaryontische Zellen besitzen für die Reifung des 3'Endes ihrer messenger-RNAs eine Nuklease, die die Sequenz AAUAAA erkennt und die transkribierte RNA in einem spezifischen Bereich dahinter spaltet, eine "Poly-A-Polymerase" synthetisiert anschließend das erforderliche Poly-A-Ende an (87). Möglicherweise hat sich in den langen linearen Viroidsträngen, wie sie während der Replikation entstehen, durch ähnliche Nuklease-Polymerase-Mechanismen der oligo-A-Bereich der Varianten in den Tomatenpflanzen verändert; so eine kombinierte Nuklease-Polymerase-Aktivität ist aber in Pflanzen noch nicht eindeutig nachgewiesen worden.

3) Die Sequenzveränderung ist durch Fehler der RNA-Polymerase im Laufe der Replikation erfolgt: RNA-Polymerasen besitzen eine Fehlerquote von 10^{-3} bis 10^{-4} ; bei einem fehlerhaften Einbau pro 10^3 bis 10^4 Nukleotiden ist damit bereits nach wenigen Replikationsrunden mit Veränderungen in der Viroid-RNA zu rechnen. Im "oligo-A-Bereich" der PSTVd-RNA befinden sich aufeinanderfolgend achtzehn Purine und wenn man annimmt, daß Purin-Purin-Übergänge leicht auftreten können, würde in diesem Bereich durch das Einsetzen eines Adenosins und der Übergang eines Adenosins in ein Guanosin die Veränderung wieder direkt zur Sequenz des type strain zurückführen.

Für die Replikation der Viroid-RNA muß eine Bindung von spezifischen Faktoren und Proteinen gefordert werden, eine Sequenzveränderung könnte die Replikation beschleunigen bzw. verlangsamen. Wenn jedoch die Viroidreplikationsvorgänge in Tomatenpflanzen ähnlich ablaufen, wie in Kartoffelzellen, sollte die Fähigkeit zur Vermehrung der Zellkulturvarianten 1 bis 3 in Tomatenpflanzen nicht durch die Sequenzveränderung im oligo-A-Bereich beeinträchtigt worden sein. Diese PSTVd-Varianten werden wahrscheinlich schon

lange in der Zellkultur vermehrt, als langsam replizierende Mutanten wären sie längst von unmutierten, schneller replizierenden Viroidmolekülen überwachsen und aus den Zellkulturen verdrängt worden. Für die Selektion einer in der Tomatenpflanze neuerlich veränderten PSTVd-Sequenz könnten auch andere Funktionen des "Viroidgenoms" verantwortlich sein. So zeigte O. Uhlenbeck im Operon des Replikasesgens des Bakteriophagen R17 (88, 89), daß sich die spezifische Bindungsfähigkeit eines Proteins an RNA durch eine einzige Mutation der RNA ändert; Mutationen und die Deletion eines Adenosin in einer RNA-Schleife verstärkten oder schwächten die Bindungsfähigkeit eines spezifischen, viralen Proteins. Die "oligo-A-Varianten" könnten in ihrer Bindungskapazität an Zellfaktoren beeinflusst werden; ein erhöhter Abbau würde zu einer geringeren Viroidmenge im Zellkern der Tomatenpflanzen führen, dadurch verbliebe nur eine kleine Menge Viroid-RNA in der Zelle und beteiligte sich an der Ausbreitung in der Pflanze.

Die mutierte Region könnte auch direkt die Weitergabe der Viroid-RNA an benachbarte Zellen oder an das vaskuläre System der Pflanze beeinflussen. In der differenzierten Pflanze ist die systemische Ausbreitung für die Viroid-RNA von vitaler Bedeutung, da sie nur in sich aktiv teilendem Gewebe stark vermehrt wird. In Zellkulturen wird die Viroid-RNA vermutlich durch Zellteilung weitergegeben, eine Selektion auf die Fähigkeit zur Ausbreitung im Pflanzengewebe besteht dadurch nicht, die "oligo-A-Varianten" würden nicht durch Selektion "aussortiert" werden. Der Vorgang der Rückmutation und Insertion des Adenins könnte während der Replikation in der Pflanze stattgefunden haben. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation würde die erneute Sequenzveränderung zu dem Viroidmolekül zurückführen, das sich in der Pflanze am besten ausbreiten kann. Die unterschiedlichen Mengen an PSTVd-Nachkommenschaft in den Spitzenblättern vier Wochen nach Inokulation und das verzögerte Auftreten der Erkrankungssymptome ließen sich so erklären.

Um diese Möglichkeiten zu untersuchen muß die PSTVd-Nachkommenschaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten, möglichst früh nach Inokulation sequenziert werden. Für eine Sequenzbestimmung auf herkömmliche Weise enthalten die jungen Blätter nach so kurzer Zeit viel zu wenig Viroid-RNA. Die Blätter von mehreren Pflanzen müßten vereint werden, um ausreichende Viroidmengen

zu erhalten, doch ließe sich dann die Entwicklung in einzelnen Pflanzen nicht mehr beurteilen. Hier ist möglicherweise der Einsatz der "polymerase-chain-reaction" (PCR) (90) sinnvoll, damit die geringen Viroidmengen aus Einzelpflanzen vermehrt werden können. Die durch reverse Transkription erstellte cDNA kann mit geeigneten Rückprimern durch "Taq-Polymerase" (91) zum Doppelstrang komplettiert werden. Der DNA-Doppelstrang wird durch Erwärmen getrennt, die beiden überschüssigen Primer können sich an die komplementäre Stelle anlagern, zu Doppelsträngen verlängert werden, erneut aufgeschmolzen werden usw.. Die erhaltene PSTVd-DNA ließe sich danach direkt sequenzieren oder in Plasmide einklonieren, vermehren und analysieren. Der Einfluß der Deletion und der Mutation auf die Rückmutationsfähigkeit der Tomatenpflanzen läßt sich getrennt bestimmen, indem man durch gezielte Mutagenese die Deletion bzw. Mutation *in vitro* erzeugt und die resultierende SP6-RNA auf Infektiosität und Sequenzveränderung der Nachkommenschaft in Tomatenpflanzen untersucht. Die stabilen Mutationen im unteren Bereich des Stäbchens ermöglichen gleichzeitig die interne Kontrolle, daß die inokulierte SP6-RNA die Infektion in den Tomatenpflanzen hervorgerufen hat.

6.2.3 Die Zellkulturvariante TCV 4

Die Zellkulturvariante 4 unterschied sich von den Varianten des "oligo-A-Bereichs". Sie besaß die vollständige Sequenz des PSTVd type strain und war damit ein Überbleibsel des ursprünglichen Inokulums, jedoch war bei den Nukleotiden 86-88 ein Guanosin deletiert, also im Bereich der zentralen konservierten Region. Da diese Region für das Zurechtschneiden und Verknüpfen zur zirkulären Viroideinheit erforderlich ist, war eine Beeinträchtigung der Zirkularisierung der SP6-Transkripte zu erwarten. Für eine hohe Infektiosität von linearer SP6-PSTVd-RNA ist mindestens eine Duplikation der sechs Nukleotide 83-88 in der oberen zentralen konservierten Region nötig (77); nach bisherigen Ergebnissen sollte die Guanosindeletion in dieser Region zu einem vollständigen Verlust der Infektiosität führen, die SP6-RNA der PSTVd-TCV 4 besaß jedoch in Tomatenpflanzen eine Infektionsrate von 70%. Die PSTVd-Nachkommenschaft dieser Zellkulturvariante wies in den Toma-

tenpflanzen die vollständige Sequenz des PSTVd type strains auf, in die Stelle der zentralen konservierten Region war wieder ein Guanosin eingefügt worden.

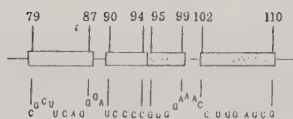
6.2.4 Modelle für das "Processing" der PSTVd-RNA

Zum Verständnis dieses Reparaturvorgangs müssen kurz die aktuellen Modellvorstellungen über das "Processing" der PSTVd-RNA erläutert werden. Für die PSTVd-"Reifung" zum zirkulären Molekül sind Sequenzen der oberen zentralen konservierten (CCR) Region in duplizierter Form an beiden Enden der linearen Moleküle erforderlich. Nach T. O. Diener (92) müssen die beiden palindromischen Sequenzen des "hairpin I", die die CCR einrahmen, jeweils an beiden Enden des linearen Moleküls vorhanden sein (Abb. 23: A)); sie ordnen sich zu einer neuen Struktur um, wobei die duplizierten Bereiche des 5'Endes und des 3'Endes sich aneinanderlagern und zu einem langen, basengepaarten Bereich führen können. Dieser Bereich zwischen Nukleotid 79 und 110 bildet drei helikale, durch kurze Loops getrennte Strukturen aus. Nukleasen schneiden die beiden Stränge in der Mitte des Symmetriebereichs durch, die direkt nebeneinander liegenden Nukleotide werden verknüpft, es entsteht ein ringförmiges Molekül.

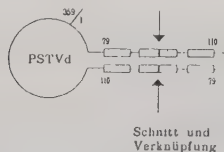
Eine ähnliche Struktur postulieren Steger und Mitarbeiter (93) für oligomere PSTVd-RNAs (Abb. 23: B)); sie gehen allerdings davon aus, daß große Teile des stäbchenförmigen Moleküls schon basengepaart in der endgültigen Struktur vorliegen. Der untere Strang der CCR wird in den Molekülen haarnadelförmig ausgestülpt, die oberen zentralen Bereiche der aneinanderhängenden Viroideinheiten können die helikalen "Diener"-Strukturen bilden. Thermodynamische Berechnungen mit oligomeren SP6-PSTVd-Molekülen zeigten, daß diese Struktur auch unter "natürlichen" Bedingungen vorliegen kann, allerdings sind nur oligomere RNAs mit (+)Polarität in der Lage, sie auszubilden.

Ein drittes Modell wird von M. Tabler (M. Tabler, pers. Mitteilung) vorgeschlagen (Abb. 23. C)). Er untersuchte durch Kürzung und gerichtete Mutagenese die Bereiche, die notwendig waren, damit *in vitro* hergestellte lineare

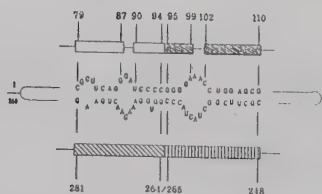
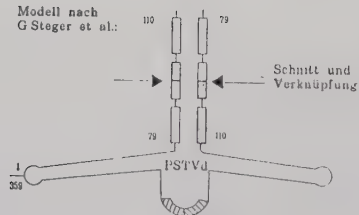
SP6-PSTVd-RNA weiterhin biologisch aktiv war. Die verschiedenen Konstrukte wurden untersucht, ob sie in Tomatenpflanzen Viroiderkrankungen hervorrufen können und ob sie nach Zugabe zu Kernextrakten aus Kartoffelzellen auf Einheitslänge zurechtgeschnitten und abschließend zirkularisiert werden. Die Untersuchungen ergaben, daß für ein erfolgreiches Processing und eine hohe Infektiosität nur eine Sequenzduplikation von 6 Nukleotiden der oberen zentralen konservierten Region (CCR) erforderlich ist, aber Veränderungen im unteren Bereich der konservierten Region nicht toleriert werden. Daraus kann man folgern, daß die PSTVd-RNA wahrscheinlich in reiner Stäbchenform vorliegt, die untere konservierte Region also nicht ausgestülpt wird. Die überzähligen, doppelt vorhandenen Nukleotide der oberen konservierten Region an den beiden Enden des linearen Moleküls stehen aus dem Stäbchen heraus und können aufgrund ihrer palindromen Sequenz zusätzliche Basenpaarungen eingehen. Die Basenpaarungen im Stäbchen und in den ausgestülpten Sequenzen stabilisieren die Stäbchenstruktur. Diese kann sich dennoch dynamisch nach beiden Seiten verändern. Eine Lücke in der Stäbchenstruktur durch Herauslösen des einen Strangendes kann aufgrund der Sequenz durch "Nachrücken" des gegenüberstehenden Strangendes geschlossen werden, ohne daß sich die Stäbchenform ändern muß. Die Nukleotide der beiden CCRs werden dadurch immer in enge Nachbarschaft gebracht, eine Nuklease kann die überstehenden Stränge abschneiden und eine Ligase die beiden Enden verbinden. Diese Möglichkeit besitzt nur der duplizierte Bereich der CCR; es gibt somit keine festgelegte Stelle, sondern nur ein Bereich, der für die Reifung zur zirkulären Viroid-RNA verantwortlich ist.



A) Modell nach T. Dieror:



B) Modell nach G. Steger et al.:



C) Modell nach M. Tabler:

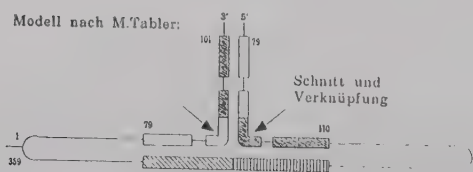


Abb. 23: Schematische Darstellung der Modelle für das PSTVd-Processing:

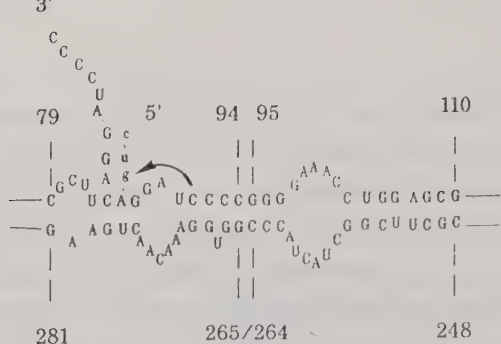
Abb. 23:

Dargestellt sind die verschiedenen Modelle für das Processing von PSTVd, das heißt, für das Zurechtschneiden und Verknüpfen der Schnittenden zum PSTVd-RNA-Ring. Das Modell nach T. O. Diener (A)) und G. Steger et al. (B)) benötigt zur Ausbildung der erforderlichen Sekundärstruktur nur die Sequenzfolge der oberen CCR, d. h. die Nukleotide Nr. 79 bis 110. Diese Region ist schematisch in Blöcken über der Sequenzdarstellung eingezeichnet. Das Modell von M. Tabler (C)) bezieht die Sequenz der "unteren zentralen Region" mit den Nukleotiden 248 bis 281 mit in die erforderliche Struktur ein. Die Nukleotidfolge des Bereichs ist ebenfalls herausvergrößert dargestellt, diese Blöcke sind schraffiert dargestellt. Die Stellen für den erforderlichen Schnitt und die Verknüpfung sind durch Pfeile gekennzeichnet.

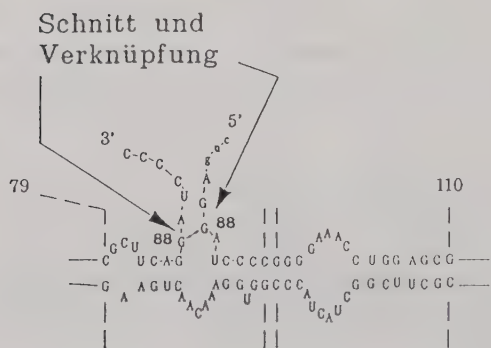
6.2.5 Ausgleich der Deletion in der Zellkulturvariante TCV 4, das Modell des "Brückenschlags"

Die Insertion des deletierten Guanosins, die Wiederherstellung der type strain Sequenz aus der TCV 4 und ihren Klonierungsderivaten kann mit dem Modell der voll ausgebildeten Stäbchenstruktur erklärt werden: Die Guanosinnukleotide in den CCR-Bereichen am 5'- und 3'Ende kommen durch die Stäbchenstruktur in direkte Nachbarschaft und einen Abstand, der Schnitt und Ligation zuläßt. Der "ausgeloopte" Bereich der Nukleotide 271-275 in der unteren CCR kann entweder mit dem 3'- oder dem 5'Ende des SP6-Transkripts überbrückt werden. Im Falle der Deletionsvariante TCV 4 bestünde "die Brücke" nur aus den ungepaarten Nukleotiden 88, 89.

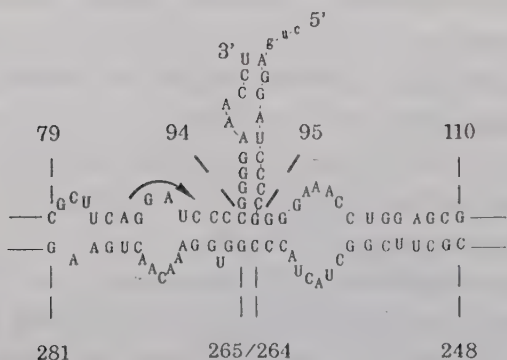
In einem dynamischen Zwischenstadium können die abstehenden 3'- und 5'Enden aber auch genau über dieser Lücke zusammentreffen, das G₈₈ am 3'Ende des Einzelstrangs kommt dann in unmittelbare Nähe zum G₈₈ am 5'Ende desselben Moleküls. Eine Nuklease könnte neben den beiden Guanosinnukleotiden schneiden, eine Ligase sie verknüpfen, es entsteht ein zirkuläres Molekül mit 359



Brückenschlag nach links



Dynamischer Zwischenzustand



Brückenschlag nach rechts

Abb. 24: Schematische Darstellung des "Brückenschlags" zur Erklärung der Deletion und/oder Insertion eines Guanodin-Restes in der "oberen" zentralen Region des PSTVd.

Nukleotiden, die Deletion des G₈₆ wird durch den Einbau des G₈₈ vom anderen Strangende ausgeglichen. Dieser Vorgang ist schematisch im mittleren Teil der Abbildung 24 durch einen kleinen Doppelpfeil angedeutet. Die Inokulation mit RNA des TCV 4 führte nicht in allen Pflanzen zur Infektion, da dieser Mechanismus wahrscheinlich nicht immer zur Ausbesserung der Deletion führt und keine infektiöse Zirkel entstehen. "Brücken", die nur aus G₈₈ und A₈₉ bestehen, sind anscheinend in Tomatenpflanzen nicht stabil, nicht vermehrbar oder werden aus sterischen Gründen nicht gebildet. Wenn die Deletion nicht im ersten Schritt, der Zirkularisierung der linearen inokulierten PSTVd-SP6-RNA revertiert werden kann, erfolgt keine Vermehrung der PSTVd-RNA in der Pflanze.

Die Struktur, die durch den Brückenschlag des 3'Endes nach rechts entsteht (siehe unterer Teil der Abbildung) ist durch die starken Basenpaarungen der vier Cytosin- und Guanosinbasen im zentralen Bereich wahrscheinlich stabiler, als der Brückenschlag des 5'Endes auf die linke Seite des "Loops" (siehe oberer Teil der Abbildung). Die Frage, warum die durch die Umklonierung in den Vektor pBBs106/66 bedingte Deletion des Guanosins 86 im 5'Bereich keinen Einfluß auf die Infektiosität der SP6-RNA des type strain hat, kann ebenfalls anhand des Brückenmodells erklärt werden. Da sich im 3'Bereich kein deletiertes Guanosin befindet, eine stabilere Brücke, der "Brückenschlag nach rechts" vom 3'Ende der SP6-RNA gebildet werden kann, ist kein "dynamischer Zwischenzustand" für die Reparatur der Deletion erforderlich, Schnitt und Verknüpfen bei den Nukleotiden 94 und 95 führt zu vollständigen infektiösen Zirkeln.

6.2.6 Infektiosität der dimerisierten Zellkulturvariante TCV 4

Bei den DNA-Konstrukten mit dimeren Viroideinheiten sollte die Brückenbildung durch das dreimalige Auftreten der benötigten Sequenzen in der CCR sogar doppelt möglich sein, eine erhöhte oder zumindest vergleichbar hohe Infektiosität wäre zu erwarten. Der dynamische Zwischenbrückenzustand jedoch, das Zusammentreffen der beiden Stränge mit ihren überlappenden Sequenzen, scheint nur selten zu entstehen, da die Infektiosität der SP6-RNA stark ab-

geschwächt ist. Möglicherweise wird der zur Reparatur der Deletion benötigte dynamische Zwischenzustand durch die Ausbildung der doppelten Stäbchenstruktur so stark behindert, daß die Deletion nur noch selten repariert werden kann, es können fast keine infektiöse Viroidzirkel entstehen. Bei der dimeren Kontrolle des type strain ist das dynamische Zwischenstadium wiederum nicht notwendig, im 3'Bereich der SP6-RNA können sich die C- und G-Paarungen stabil ausbilden, der Schnitt und das Verknüpfen kann bei den Nukleotiden 94 und 95 erfolgen, es entsteht in jedem Fall eine komplette PSTVd type strain Sequenz.

Offen bleiben noch die folgenden Fragen:

Führt auch die alleinige Deletion eines Adenosins im "oligo-A-Bereich" zu den beobachteten Verschiebungen in der Symptomausprägung? Ist der "oligo-A-Bereich" für die systemische Verbreitung im ausdifferenzierten Gewebe der Pflanze wichtig? Bleiben im Gegensatz dazu die Deletionen in der PSTVd-Nachkommenschaft in Kallus- und Suspensionszellen, die neu mit den verschiedenen Zellkulturvarianten infiziert wurden, stabil?

6.3 Dynamik der Sequenzveränderungen in der PSTVd-RNA

Untersuchungen an viralen RNA-Genomen von Bakterien, tierischen Zellen und Pflanzenzellen haben ergeben, daß die hohe Fehlerrate bei der Replikation von RNA-Genomen über RNA-Intermediäre schon nach wenigen Generationen zu großen Sequenzunterschieden führt (94,95). Die "Quasispezies" in der Nachkommenschaft eines mehrmals vermehrten Klonen (96) besteht aus Nachkommen des Ausgangsklons, des Wildtyps, der am besten adaptierten RNA und mehreren neu entstandenen Mutanten. Nach mehreren Replikationszyklen entsteht durch die hohe Mutationsrate und durch die Selektion auf überlebensfähige Mutanten ein Gleichgewicht in dieser RNA-Population. Viele Mutationen führen zu letalen Mutanten, das "Überleben" der RNA wird jedoch durch eine hohe Replikationsrate und eine Minimalisierung der Genomgröße gesichert. Die Sequenz einer permanent replizierten RNA wird hauptsächlich durch einen starken Selektionsdruck stabilisiert, dabei kann sie sich gleichzeitig durch

eine hohe Rate an Auf- und Abbaureaktionen diesem Selektionsdruck immer wieder neu anpassen. Dies gilt auch für die Replikation der Viroid-RNA in Zellkultur und Tomatenpflanzen. Im Verlauf der Viroidreplikation scheint eine große Anzahl von Mutationen aufzutreten. Die hohe Mutabilität gewährleistet die Anpassungsfähigkeit an einen neuen Wirt und ermöglicht sogar die Reparatur von Deletionen.

Alle bisher durchgeführten Experimente mit *in vitro* Mutagenese haben gezeigt, daß geringfügige Sequenzveränderungen in der PSTVd-RNA zu einer völligen biologischen Inaktivierung führen. Dagegen waren Mutationen und sogar Deletionen, die *in vivo* in den permanent infizierten Zellkulturen entstanden waren infektiös; sie führten allerdings entweder zu einer Verzögerung im Infektionsverlauf oder zu einer Abschwächung der Infektiosität. Im Verlauf der Vermehrung in Pflanzen wurde ihre Sequenz jedoch wieder "vervollständigt", die Deletion wurde immer ausgebessert. In den Zellen der Kulturlinie M316 und RK46 müssen starke Selektionseinflüsse herrschen, denn im Laufe von zwei Jahren hat sich die Viroidsequenz trotz permanenter Replikation nicht verändert und im Laufe von acht Jahren waren nur geringfügige Veränderungen eingetreten. Auch das Ausgangsinokulum war in beiden Zellkulturen noch vorhanden, die Zellkulturvariante TCV 4 besaß, abgesehen von der Deletion noch immer die unveränderte Sequenz des PSTVd type strain. Die Sequenz des PSTVd type strain ist an eine systemische Infektion der schnell wachsenden Tomatenpflanze sehr gut angepaßt, sie ist sogar hoch verdünnt stark infektiös. In den inokulierten Tomatenpflanzen revertieren die in einem achtjährigen Prozeß entstandenen Zellkulturvarianten einer achtwöchigen Mikroevolution fast vollständig zurück zum "Wildtyp", dem PSTVd type strain.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Aspekte der Vermehrung des Potato Spindle Tuber Viroids in den Zellen einer Wirtspflanze, der Wildkartoffel *Solanum demissum*, sollten untersucht werden.

Zunächst war zu prüfen, ob die Vermehrung nach dem postulierten, "rolling-circle"-ähnlichen Mechanismus abläuft und in welchem zeitlichen Verlauf sich die Synthese der Intermediärprodukte abspielt.

Zweitens galt es zu klären, ob sich das Viroidgenom durch permanente Vermehrung in Gewebekulturen verändert.

- 1.1 Um Aufschluß über den Mechanismus und den Verlauf der Viroidreplikation zu gewinnen, mußten die Zwischenstufen der Viroidneusynthese näher charakterisiert werden. Dafür boten sich Versuche mit Protoplasten an, da diese in großen Mengen mit PSTVd inokuliert werden können. Um eine erfolgreiche Inokulation von Protoplasten zu erreichen, wurde die Viroid-RNA in Liposomen eingeschlossen. Durch Zugabe von 13% Polyethylenglykol wurden die Liposomen mit den Protoplasten fusioniert. Die Verfestigung des Regenerationsmediums durch Agarose machte es möglich, vereinzelte Protoplasten zu "Zellklonen" zu regenerieren. Die Anzahl der viroidinfizierten Mikrokalli zeigte die Infektiosität der verwendeten Mengen PSTVd-RNA im Inokulum auf. 750 ng PSTVd-RNA pro 1 Million Protoplasten genügte, um über 90% der Protoplasten zu infizieren.
- 1.2 Die Inokulation von Protoplasten mit PSTVd führte nach vierundzwanzig Stunden zur Neusynthese von PSTVd-komplementärer (-)RNA; zu diesem Zeitpunkt war eine Abnahme der PSTVd(+)RNA zu beobachten. Erst nach achtundvierzig Stunden nahm der Gehalt an PSTVd(+)RNA stark zu. Die neusynthetisierte, komplementäre PSTVd(-)RNA bestand aus einer Mischung von linearen Molekülen mit mehrfacher Viroideinheitslänge. Sie diente als Matrize für die Neusynthese der PSTVd(+)RNA. Die zusätzliche Auftrennung der Gesamt-RNA unter Bedingungen, die die Doppelstränge der Nukleinsäuren nicht aufbrechen, zeigte, daß Teile der

inokulierten PSTVd(+)RNA mit den neusynthetisierten oligomeren PSTVd(-)RNAs zusammenhängen.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß die Vermehrung der PSTVd-RNA über Intermediärkomplexe aus monomerer (+)RNA und oligomerer (-)RNA abläuft und unterstützen die Annahme, daß sie über einen rolling-circle-ähnlichen Mechanismus erfolgt.

- 2.1 Für die Untersuchung, ob sich das Viroidgenom bei permanenter Vermehrung durch zelluläre RNA-Polymerasen verändert, wurden infizierte Zelllinien ausgewählt, die zwei bzw. acht Jahre weiterkultiviert worden waren. Die Viroidnachkommenschaft aus diesen Zelllinien wurde auf Infektiosität und Sequenzveränderungen analysiert. Nach zweijähriger Vermehrung in Zellkultur zeigte die Viroidnachkommenschaft keine Veränderungen in der Nukleotidsequenz, auch das Infektionsverhalten änderte sich nicht. Nach achtjähriger Viroidvermehrung in Kultur traten im Biotest die Krankheitssymptome bei Tomatenpflanzen verlangsamt auf. Die Sequenzierung der PSTVd-RNA dieser Zelllinie ergab, daß die permanente Replikation die Nukleotidsequenz verändert hatte. Es war eine Mutante entstanden, die eine Deletion und drei Mutationen aufwies. Sie besaß, im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten Sequenzvarianten mit 359 Nukleotiden, nur 358 Basen und war im Gegensatz zu allen bisher *in vitro* hergestellten Deletionsmutanten unverändert infektiös.
- 2.2 Die Klonierung der PSTVd-cDNA und die Sequenzierung ausgewählter Klone zeigte, daß die Zelllinie noch weitere Sequenzvarianten mit jeweils 358 Nukleotiden enthielt. Diese Varianten ließen sich aufgrund ihrer Sequenz und ihres Infektionsverhaltens bei Tomatenpflanzen in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe besaß die Deletion und eine benachbarte Mutation zwischen Nukleotid 55 und 64, also im sogenannten "oligo-A-Bereich", der in der zweidimensionalen Darstellung sich im linken oberen Teil des Viroidstäbchens befindet. Alle Tomatenpflanzen, die mit *in vitro* transkribierter SP6-RNA dieser Gruppe inokuliert wurden, erkrankten, sie zeigten jedoch die typi-

schen Krankheitssymptome verspätet. Die Analyse der PSTVd-Nachkommenschaft aus einzelnen Pflanzen ergab, daß die Sequenzveränderung des Inokulums im oligo-A-Bereich in der Pflanze rückgängig gemacht worden war. Es hatte eine Reversion zur Sequenz des PSTVd type strain stattgefunden, die Nachkommen besaßen wieder 359 Nukleotide. Die weiteren Mutationen im Viroidmolekül waren nicht verändert worden.

- 2.3 Die zweite Gruppe bestand aus nur einer Deletionsmutante. Diese Sequenzvariante, die TCV 4, besaß, abgesehen von der Deletion, die sich im Bereich der oberen konservierten Region befand, die Sequenz des PSTVd type strain. Die SP6-RNA dieser Zellkulturvariante führte nicht in allen Versuchspflanzen zu einer Infektion, die Krankheits-symptome traten jedoch bei den infizierten Pflanzen zum gleichen Zeitpunkt auf wie bei Pflanzen, die zum Vergleich mit PSTVd type strain inokuliert worden waren. Die Analyse der Nachkommenschaft aus den infizierten Pflanzen zeigte, daß auch hier die Deletion in den Pflanzen ausgeglichen wurde. Die Nachkommenschaft besaß wieder 359 Nukleotide. Da die Deletion der TCV 4 in einem Bereich liegt, der für das "Processing", das Zurechtschneiden der linearen RNA auf Einheitslänge und das Verknüpfen zum infektiösen Zirkel von Bedeutung ist, erfolgt die "Reparatur" wahrscheinlich während des Processings. Ein mögliches Modell zum Reparaturmechanismus wird diskutiert.

Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß das PSTVd-Genom in zwei verschiedenen Wirtszellen mit unterschiedlichen Differenzierungsstufen Sequenzveränderungen in unterschiedlichen Richtungen erfährt. In der Zellkultur veränderte und verkürzte Sequenzvarianten werden in ausdifferenzierten Pflanzen wieder zum Wildtyp zurückgeführt.

8. LITERATUR

- 1 Martin, W. H. (1922). "Spindle Tuber", a new potato trouble. Hints to potato growers, New Jersey State Potato Assoc. 3, No.8: 4.
- 2 Raymer, W. B., and O'Brien, M. J. (1962). Transmission of potato spindle tuber virus to tomato. *Am. Potato J.* 39: 401-408.
- 3 Diener, T. O. (1979). Potato spindle tuber disease. p. 52-58, in: *Viroids and Viroid Diseases*, Diener T. O. (ed), Wiley-Interscience, New York.
- 4 Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber "virus" IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* 45: 411-428.
- 5 Singh, R. P., and Clark, M. C. (1971). Infectious low-molecular weight ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 1077-1082.
- 6 Sanger, H. L. (1972). An infectious and replicating RNA of low molecular weight: The agent of the Exocortis disease of Citrus. *Adv. Biosci.* 8: 103-116.
- 7 Semancik, J. S., and Weathers, L. G. (1972). Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature (New Biol.)* 237: 242-244.
- 8 Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J., Kleinschmidt, A. K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* 73: 3852-3856.
- 9 Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., Sanger, H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273: 203-208.
- 10 Gross, H. J., Liebl, H., Alberty, H., Krupp, G., Domdey, H., Ramm, K., and Sanger, H. L. (1981). A severe and a mild potato spindle tuber viroid differ in 3 nucleotide exchanges only. *Biosci. Rep.* 1: 235-341.
- 11 Sanger, H. L. (1982). Biology, structure, functions and possible origin of viroids. p. 368-454, in: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series Vol. 14B, Parthier, B., and Boulter, D. (eds), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

- 12 Camacho Henriquez, A., and Sanger, H. L. (1982). Gelelectrophoretic analysis of phenol extractable leaf proteins from different viroid/host combinations. *Arch. Virol.* **74**: 167-180.
- 13 Muhlbach, H.-P., Camacho Henriquez, A., and Sanger, H. L. (1977). Isolation and properties of protoplasts from leaves of healthy and viroid-infected tomato plants. *Plant Sci. Lett.* **8**: 183-189.
- 14 Muhlbach, H.-P., Camacho Henriquez, A., and Sanger, H. L. (1977). Infection of protoplasts by ribonucleic acid of tobacco mosaic virus and by viroids. *Phytopathol. Z.* **90**: 289-305.
- 15 Muhlbach, H.-P., and Sanger, H. L. (1979). Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature* **278**: 185-188.
- 16 Zelzer, A., van Adelsberg, J., Leonard, D. A., and Zaitlin, M. (1981). Plant cell suspensions cultures sustain long term replication of potato spindle tuber viroid. *Virology* **109**: 314-322.
- 17 Muhlbach, H.-P., and Sanger, H. L. (1981). Continuous replication of potato spindle tuber viroid (PSTV) in permanent cell cultures of potato and tomato. *Biosci. Rep.* **1**: 79-87.
- 18 Marton, L., Duran-Vila, N., Lin, J. J., and Semancik, J. S. (1982). Properties of cell cultures containing the citrus exocortis viroid. *Virology* **122**: 229-238.
- 19 Spiesmacher, E., Muhlbach, H.-P., Schnolzer, M., Haas, B., and Sanger, H. L. (1983). Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTV) and of its complementary RNAs are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.* **3**: 767-774.
- 20 Spiesmacher, E., Muhlbach, H.-P., Tabler, M., and Sanger, H. L. (1985). Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTV) in isolated nuclei and its impairment by transcriptional inhibitors. *Biosci. Rep.* **5**: 251-265.
- 21 Zelcer, A., Zaitlin, M., Robertson, H. D., and Dickson, E. (1982). Potato spindle tuber viroid-infected tissues contain RNA complementary to the entire viroid. *J. Gen. Virol.* **59**: 139-148.
- 22 Muhlbach, H.-P., Faustmann, O., and Sanger, H. L. (1983). Conditions for optimal growth of a PSTV-infected potato cell suspension and detection of viroid-complementary longer-than-unit-length RNA in these cells. *Plant Mol. Biol.* **2**: 239-247.

- 23 Berlin, J., Wray, V., Forche, E., Reng, H. G., Schüler, H., Luckinger, R., Mühlbach, H.-P. (1985). Production of potato spindle tuber viroid (PSTV) by large scale fermentation of PSTV-infected potato cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* **36**: 1985-1995.
- 24 Grill, L. K., and Semancik, J. S. (1978). RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acids preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 896-900.
- 25 Rohde, W., and Sängner, H. L. (1981). Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by northern blot hybridisation. *Biosci. Rep.* **1**: 327-336.
- 26 Branch, A. D., Robertson, H. D., and Dickson, E. (1981). Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6381-6385.
- 27 Branch, A. D., and Robertson, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**: 450-455.
- 28 Sängner, H. L. (1987). Viroid replication. p. 117-166, in: *The Viroids*, Diener, T. O. (ed), Plenum Press, New York, London.
- 29 Tsagris, M., Tabler, M., Mühlbach, H.-P., and Sängner, H. L. (1987). Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed *in vitro* to the monomeric circular viroid proper, when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. *EMBO J.* **6**: 2173-2183.
- 30 Schumacher, J., Sängner, H. L., and Riesner, D. (1983). Subcellular localisation of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J.* **2**: 1549-1555.
- 31 Wolff, P., Gilz, R., Schumacher, J., and Riesner, D. (1985). Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucl. Acids Res.* **13**: 355-367.
- 32 Fromm, M., Callis, J., Taylor, L., and Walbot, V. (1987). Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. *Meth. Enzymol.* **153**: 351-366.
- 33 Negrutiu, J., Shillito, R., Potrykus, I., Biasini, G., and Sala, F. (1987). Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. *Plant Mol. Biol.* **8**: 363-373.
- 34 Keller, W. A., Melchers, G. (1973). The effect of high pH and high calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch.* **28c**: 737-741.

- 35 Attree, S. M., and Sheffield, E. (1986). An evaluation of Ficoll density gradient centrifugation as a method for eliminating microbial contamination and purifying plant protoplasts. *Plant Cell Rep.* 5: 288-291.
- 36 Adams, T. L., and Townsend, J. A. (1983). A new procedure for increasing efficiency of protoplast plating and clone selection. *Plant Cell Rep.* 2: 165-168.
- 37 Bangham, A. D., Hill, M. W., and Miller, N. G. A. (1974). Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Methods Membr. Biol.* 1: 1-68.
- 38 Szoka, F. Jr, and Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (Liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467-508.
- 39 Fraley, R. T. (1983). Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into petunia protoplasts; improved conditions for liposome:protoplast incubations. *Plant Mol. Biol.* 2: 5-14.
- 40 Makins, J. F. (1983). The theory and practical applications of liposome-protoplast interactions. p. 197-207, in: *Protoplasts 1983, Lecture Proceedings/ 6th Internat. Protoplast Symposium, Experientia Suppl. Vol. 46.* Potrykus, I., Harms, C. T., Hinnen, A., Hütter, R., King, P. J., Shillito, R. D. (eds.) Birkhäuser Verlag, Basel 1983.
- 41 Commerford, S. L. (1971). Iodination of nucleic acids *in vitro*. *Biochemistry* 10: 1993-2000.
- 42 Chaconas, G., and van de Sande, J. K. (1980). 5'-³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Meth. Enzymol.* 65: 75-88.
- 43 Krieg, P. A. and Melton, D. A. (1987). *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Meth. Enzymol.* 155: 397-415.
- 44 Rickwood, D. (1984). The theory and practice of centrifugation. p. 1-41. Hames, B. D. (1984). Choice of conditions for density gradient centrifugation. p. 46-91, in: *Centrifugation (2nd ed.): A practical approach*, Ed. Rickwood, D., IRL Press, Oxford.
- 45 Rickwood, D. (1983). Properties of iodinated density gradient media. p. 1-21, in: *Iodinated density gradient media: A practical approach*, Ed. Rickwood, D., IRL Press, Oxford.

- 46 Carmichael, C. C., and McMaster, G. K. (1980). The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Meth. Enzymol.* **65**: 380-391.
- 47 Ansorge, W., and Maeyer, L. (1980). Thermally stabilized very thin polyacrylamide gels for electrophoresis. *J. Chromatography* **202**: 45-53.
- 48 Goldman, D., and Merrill, C. R. (1982). Silverstaining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis* **3**: 24-26.
- 49 Stellwag, E. J., and Dahlberg, A. E. (1980). Electrophoretic transfer of DNA, RNA and proteins onto diazobenzyloxymethyl (DBM)-paper. *Nucl. Acids Res.* **8**: 299-316.
- 50 Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 5201-5205.
- 51 Thomas, P. S. (1983). Hybridisation of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Meth. Enzym.* **100**: 255-266.
- 52 Herold, T. (1986). Optimierung des spezifischen Nachweises von Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) (+) und (-) RNA durch molekulare Hybridisierung und teilweise Charakterisierung einer zellulären RNA aus gesunden Tomatenpflanzen, die mit PSTV(+)RNA hybridisiert. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- 53 Schumacher, J., Randles, J. W., and Riesner, D. (1983). A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.* **135**: 288-295.
- 54 Öfverstedt, L.-G., Hammerström, K., Balgobin, N., Hjertén, S., Petterson, U., and Chattopadhyaya, J. (1984). Rapid and quantitative recovery of DNA fragments from gels by displacement electrophoresis (Isotachophoresis). *BBA* **782**: 120-126.
- 55 Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- 56 Tabler, M., Günther, I., Kern, R., and Sanger, H. L. (1989). A microscale procedure for isolating and sequencing the viroid RNA present in one gram of infected leaf tissue. *J. Virol. Methods* **23**: 111-126.

- 57 Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzym.* **65**: 499-560.
- 58 Rubin, C. M., and Schmid, C. W. (1980). Pyrimidine-specific reactions useful for DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **8**: 4613-4419.
- 59 Dagert, M., and Ehrlich, S. D. (1974). Prolonged inkubation in Calcium Chloride improves competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28
- 60 Hanahan, D. (1985). Techniques for Transformation of *E. coli*. p. 109-135, in: *DNA Cloning Vol. I, A Practical Approach*. Glover, D. M., Ed., IRL Press, Oxford/England.
- 61 Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzym.* **100**: 243-255.
- 62 Holmes, D. S., and Quingley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- 63 Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1522.
- 64 Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463- 5467.
- 65 Faustmann, O. (1986). Liposomen-induzierte Infektion von Kartoffel (*Solanum tuberosum*) Protoplasten mit dem Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) und PSTV spezifischen DNA Molekülen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- 66 Faustmann, O., Kern, R., Sängner, H. L., and Mühlbach, H.-P. (1986). Potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA oligomers of (+) and (-) polarity are synthesized in potato protoplasts after liposome-mediated infection with PSTV. *Virus Res.* **4**: 213-227.
- 67 Nishiguchi, M., Langridge, W. H. R., Szalay, A. A., and Zaitlin, M. (1986). Electroporation mediated infection of tobacco leaf protoplasts with tobacco mosaic virus RNA and cucumber mosaic virus RNA. *Plant Cell Rep.* **5**: 57-60.
- 68 Shillito, R. D., Paszkowski, J., and Potrykus, I. (1983). Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep.* **2**: 224-247.

- 69 Murashige, I., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-479.
- 70 Kao, K. N., and Michayluk, M. R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* **126**: 105-110.
- 71 Müller, W. (1986). New phase supports for liquid-liquid partition chromatography of biopolymers in aqueous poly(ethyleneglycol)-dextran systems. *Eur. J. Biochem.* **155**: 213-222.
- 72 Tsagris, E. M. (1987). Prozessierung der RNA des Potato Spindle Tuber Viroids (PSTV) in vitro. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- 73 Cress, D. E., Kiefer, M. C., and Owens, R. A. (1983). Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA clones. *Nucl. Acids Res.* **11**: 6821-6835.
- 74 Meshi, T., Ishikawa, M., Ohno, T., Okada, Y., Sano, T., and Shikada, E. (1984). Double stranded cDNAs of hop stunt viroid are infectious. *J. Biochem.* **95**: 1521-1524.
- 75 Tabler, M., and Sängner, H. L. (1984). Cloned single and double stranded DNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA and coinoculated subgenomic cDNA fragments are infectious. *EMBO J.* **3**: 3055-3062.
- 76 Tabler, M., and Sängner, H. L. (1985). Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized *in vitro* with the SP6 transcription system. *EMBO J.* **4**: 2191-2199.
- 77 Tabler, M. (1986). Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung des "Potato Spindle Tuber" Viroids (PSTV) mit Hilfe von DNA- und RNA-Konstrukten. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- 78 Puchta, H., and Sängner, H. L. (1988). An improved procedure for the rapid one-step-cloning of full-length viroid cDNA. *Arch. Virol.* **101**: 137-140.
- 79 Chen, E. Y., and Seeburg, P. H. (1985). Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**: 165-170.
- 80 Zuker, M., and Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucl. Acids Res.* **9**: 133-149.

- 81 Keese, P., Visvader, J. E., and Symons, R. H. (1988). Sequence variability in plant viroid RNAs. p. 72-98, in: RNA Genetics, Vol III, Variability of RNA genomes, Domingo, E. , Holland, J. J., Ahlquist, P. (eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 82 Mühlbach, H.-P., Kern, R., and Luckinger, R. (1987). Potato spindle tuber viroid replication in cell suspension cultures and protoplasts of potato. p. 659, in: Plant Molecular Biology: von Wettstein, D., and Chua, N.-H. (eds.), NATO ASI Series, Series A, Vol. 140, Plenum Press, New York and London.
- 83 Branch, A. D., Willis, K. K., Davatelis, G., Robertson, H. D. (1985). In vivo intermediates and the rolling circle mechanism in viroid replication. p. 201-234, in: Subviral pathogens of plants and animals: Viroids and Prions. Maramorosch, K., and McKelvey, J. J. Jr., Academic Press, Orlando, Florida.
- 84 King, A. M. Q. (1987). RNA viruses do it. TIG 3: 60-61.
- 85 Hammond, R. H., Smith, D. R., and Diener, T. O. (1988). Columnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. VII. International Congress of Virology, Osaka, Japan; Abstract 4-3.
- 86 Puchta, H., Ramm, K., and Sängner H. L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occuring world wide in hops. Nucl. Acids Res. 16: 4197-4216.
- 87 Humphrey, T., and Proudfoot, N. J. (1988). A beginning to the biochemistry of polyadenylation. TIG 4: 243-245.
- 88 Lowary, P. T., and Uhlenbeck, O. C. (1987). An RNA mutation that increases the affinity of an RNA-protein interaction. Nucl. Acids Res. 15: 10483-10493.
- 89 Wu, H.-N., and Uhlenbeck, O. C. (1987). Role of a bulged A residue in a specific RNA-protein interaction. Biochemistry 26: 8221-8227.
- 90 Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Millis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.
- 91 Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, B. K., and Ehrlich, H. A. (1988). Primer directed

enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

- 92 Diener, T. O. (1986). Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 58-62.
- 93 Steger, G., Tabler, M., Brüggemann, W., Colpan, M., Klotz, G., Sängler, H. L., and Riesner, D. (1986). Structure of viroid replicative intermediates: physico-chemical studies on SP6 transcripts of cloned oligomeric potato spindle tuber viroid. *Nucl. Acids Res.* **14**: 9613-9630.
- 94 Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and Vandepol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**: 1577-1585.
- 95 Van Vloten-Doting, L., Bol, J.-F., and Cornelissen, B. (1985). Plant-virus-based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. *Plant Mol. Biol.* **4**: 323-326.
- 96 Biebricher, C. K. (1983). Darwinian selection of self-replicating RNA molecules. p. 1-52, in: *Evolutionary Biology*, Vol. 16, Hecht, M. K., Wallace, B. (eds), Plenum Press, New York.

LEBENS LAUF

6.2.1955	geboren in Kehl am Rhein Eltern: Elfriede und Andreas Kern
1975	Abitur an der Heimschule St. Landolin, Ettenheim
1975-77	Studium der Biologie an der Universität Ulm
1977	Vordiplom
1978-82	Studium der Biologie an der Technischen Universität München
1982	Diplom Thema der Diplomarbeit: Isolierung und Charakterisierung eines Deazaflavins aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> Δ H. Betreuer: Prof. Dr. Dr. A. Bacher, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München
1983-84	Zivildienst
Juli 1984- Mai 1989	Anfertigung der Doktorarbeit am Max-Planck- Institut für Biochemie, Martinsried Abteilung Viroidforschung, Betreuer: Prof. Dr. H.-P. Mühlbach

